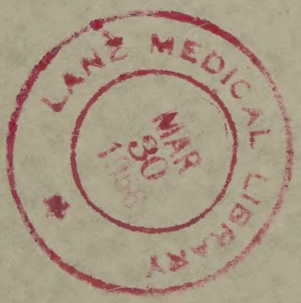
Leiden
1955

HET METABOLISME VAN GEMERKT CORTICOTROPHINE IN RATTEN



A. CATS

HET METABOLISME VAN GEMERKT CORTICOTROPHINE IN RATTEN

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr J. N. BAKHUIZEN VAN DEN BRINK, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER GODGELEERDHEID, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 23 FEBRUARI 1955, DES NAMIDDAGS TE 3 UUR

DOOR

ARNOLD CATS

GEBOREN TE ENSCHEDE IN 1924

Uitgeverij Excelsior — 's-Gravenhage

PROMOTOR: PROF.DR A. QUERIDO

VOOR MARIANNE

Dit onderzoek werd verricht in het laboratorium van de afdeling Endocrinologie en Stofwisselingsziekten van het Academisch Ziekenhuis te Leiden (Hoofd Prof. Dr A. Querido).

Voor de belangstelling in mijn werk getoond ben ik Prof. Dr A. Querido zeer erkentelijk.

Het verrichten van deze studie werd mede gestimuleerd door de onderzoekingen, welke in deze afdeling in samenwerking met de afdeling Rheumatologie (Hoofd Prof. Dr J. Goslings) werden gedaan naar de therapeutische mogelijkheden van corticotrophine bij bindweefselaandoeningen. Bij deze studie werd finantiele steun verkregen van de Gezondheidsorganisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek.

Met zeer grote erkentelijkheid zij gewag gemaakt van het profijt, dat bij de bewerking van dit proefschrift uit discussie en samenwerking met Dr A.A.H. Kassenaar getrokken mocht worden.

De autoradiogrammen werden gemaakt op de Pharmacologische afdeling van het Medisch-Biologisch Instituut van de R.V.O.-T.N.O. te Rijswijk. Veel dank ben ik verschuldigd aan Dr C. van der Meer voor zijn medewerking en raadgevingen in deze.

Dr J.D.H. Homan (N.V. Organon, te Oss) ben ik dankbaar voor zijn adviezen en voor de preparaten die hij ons verstrekte.

De hulp die ik van de verschillende medewerkers van het laboratorium van de afdeling mocht ontvangen heb ik steeds op hoge prijs gesteld.

INHOUD

Hoofdstuk I:	Inleiding	9
Hoofdstuk II:	Het merken van eiwitten	14
Hoofdstuk III:	Het verdelingspatroon van gemerkte eiwitten bij ratten 20 min. na de injectie	21
Hoofdstuk IV:	Invloed van de nier en lever op de hoeveelheid toegediend gemerkt corticotrophine	33
Hoofdstuk V:	Correlatie tussen de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed en in de nier	38
Hoofdstuk VI:	Omzetting, space en halveringstijd van gemerkt corticotrophine	43
Hoofdstuk VII:	Uitscheiding van gemerkt corticotrophine met de urine	50
Hoofdstuk VIII:	Localisatie van gemerkt corticotrophine in de nier	60
Hoofdstuk IX:	Verandering van het verdelingspatroon van gemerkt corticotrophine na langdurige voorbehandeling met dit hormon	73
Aanhangsel		81
Samenvatting		84
Summary		86
Literatuurlijst		88

Hoofdstuk I

INLEIDING

> Unfortunately we do not clearly understand the nature of a protein.
> Rittenburg (1951)

Bij het bestuderen van het metabolisme van corticotrophine dienen wij ons te realiseren, dat wij met een eiwit dat een specifiek biologische activiteit bezit, te maken hebben. Alvorens op het metabolisme van corticotrophine in te gaan, wordt hier in het kort besproken, wat er in het algemeen over het metabolisme van eiwitten bekend is.

Eiwitten die het lichaam via het darmkanaal binnentreden, worden voornamelijk tot hun bouwstenen, de aminozuren afgebroken en daarna geresorbeerd. In het organisme worden uit deze aminozuren weer eiwitten gesynthetiseerd. Sprinson en Rittenberg (1949, 1951) berekenden uit experimenten met gemerkt glycine en gemerkt ureum de grootte van de „metabolic pool" voor stikstof en de hoeveelheid eiwit die per etmaal door de verschillende weefsels gesynthetiseerd wordt. Onder „metabolic pool" verstaan deze onderzoekers dat mengsel van verbindingen, welke zowel uit het dieet, als uit de afbraak van weefsels afkomstig zijn, dat het dier (of orgaan of cel) gebruikt voor de opbouw van weefselbestanddelen.

Schoenheimer en medewerkers (1950) wisten aannemelijk te maken, dat bij een volwassene, die gedurende voldoende lange tijd een in evenwicht verkerende N-balans heeft, per tijdseenheid evenveel eiwit gesynthetiseerd wordt, als wordt omgezet in metabolieten. Er bestaat dus een dynamische evenwichtstoestand (dynamic steady state), (de Witt Stetten, 1952).

Vooral door het werk van Bergmann en medewerkers is bekend geworden, dat iedere cel enzymen bezit, die in staat zijn eiwitten af te breken.

De opbouw van eiwitten behoeft niet uitsluitend uit enkelvoudige aminozuren te geschieden.

Yuile c.s. (1951, 1952) zagen, dat plasma eiwitten, zonder volledig afgebroken te zijn tot aminozuren, in weefsel eiwitten kunnen overgaan.

Omgekeerd blijkt het uit de experimenten van Miller c.s. (1954, 1954a), dat de lever de bron is voor de meeste plasma eiwitten. Deze onderzoekers doorstroomden gedurende 6 uur rattenlevers met bloed waaraan een aminozuur mengsel, dat met C 14 gemerkt lysine bevatte, was toegevoegd. Zowel in de albumine, als in de alpha- en betaglobuline fracties werd gemerkt lysine ingebouwd. In de gammaglobuline fractie werd geen C 14 teruggevonden. Uit proeven, verricht bij gehepatectomeerde ratten, bleek, dat de gammaglobulines de voornaamste eiwitten waren die buiten de le-

ver geproduceerd werden. Verder verschenen kleine hoeveelheden alpha- en betaglobulines bij deze ratten in de circulatie.

Beschouwingen over het metabolisme van enkele eiwitachtige hormonen

Corticotrophine, thyreotroop hormon, insuline, etc. zijn eiwitten met een specifiek biologische werking, die, behalve gedurende de zwangerschap, op één bepaalde plaats in het lichaam geproduceerd worden en naar de bloedbaan worden afgegeven.

Deze hormonen komen onder normale omstandigheden in zeer kleine hoeveelheden in de circulatie voor, zodat zij hierin slechts op grond van hun specifiek biologische eigenschappen aangetoond kunnen worden. Lameyer c.s. (1955) toonden met behulp van de electrophorese techniek aan, dat het thyreotroop hormon op de plaats van de betaglobulines in het bloed gelocaliseerd kan worden. Ook andere eiwitachtige hormonen, insuline (o.a. Groen c.s. 1952), corticotrophine (Paris c.s. 1954) en gonadotrophine (o.a. Rubin c.s. 1946) zijn in het bloed aangetoond.

Evenals dit bekend is van eiwitten in het algemeen, kan het metabolisme van eiwitachtige hormonen onder verschillende condities in het organisme, gewijzigd worden. Het regulatie mechanisme van de verschillende eiwitachtige hormonen zou hieronder gerekend kunnen worden, m.a.w. bij een teveel of te weinig van bepaalde stoffen in het organisme verandert het metabolisme van de eiwitachtige hormonen. Zo is het bekend, dat na adrenalectomie een verhoogde bloedspiegel van corticotrophine ontstaat. Toediening van bijnierschors steroiden kan in een situatie die een verhoogde corticotrophine spiegel in het bloed veroorzaakt zou hebben, deze binnen bepaalde grenzen handhaven (Sayers 1950). Het is mogelijk dat cortison of zijn metabolieten een directe invloed hebben op het metabolisme van corticotrophine of dat door een veranderde toestand van de weefsels indirect dit metabolisme gereguleerd wordt. Ingle c.s. (1953a) acht het weinig waarschijnlijk, dat cortison zelf de bepalende factor is. Zoals Querido c.s. (1955) konden aantonen, blijkt de toestand van de weefsels van invloed te kunnen zijn op het metabolisme van een eiwitachtig hormon (thyreotroop hormon). Na toediening van thyreotroop hormon aan gethyreoidectomeerde konijnen bleek de verdwijningssnelheid uit de bloedbaan van thyreotroop hormon 3 dagen na de thyreoidectomie niet veranderd te zijn. Deze nam 42-152 dagen na de schildklierextirpatie wel af. Na adrenalectomie neemt de hoeveelheid corticotrophine in het bloed en de hypophyse toe (Gemzell c.s. 1946). Deze onderzoekers gingen na met welke snelheid bij ratten na adrenalectomie de hoeveelheid corticotrophine in het bloed en de hypophyse toeneemt. Uit deze gegevens berekenden deze onderzoekers dat door de hypophyse per uur ≥ 4.9 µg corticotrophine geproduceerd was.

Structuur van corticotrophine

Voor het zuiveren van eiwitten met een specifiek biologische

activiteit zullen de hierbij bereide fracties met behulp van een biologische testmethode op hun werkzaamheid getoetst moeten worden. Nadat bewezen was (Smith en Smith 1923, 1927), dat met een extract, gemaakt uit de voorkwab van runderhypophyses, bijnierschorsatrophie opgeheven kon worden, heeft men steeds getracht hypophyseextracten verder te zuiveren met behoud van hun bijnierstimulerende werking.

De specifiek biologische activiteit van deze eiwitmengsels werden getest bij hypophyseloze ratten op hun groeibevorderende werking van de bijnieren (Collip c.s. 1933) of op de eigenschap dat na toediening van corticotrophine het ascorbinezuur-gehalte van de bijnier daalt (Sayers c.s. 1948).

Tussen 1933 en 1941 heeft voornamelijk de groep van Collip zich met de zuivering van corticotrophine bezig gehouden. In 1952 gaf Astwood een uitgebreid overzicht over de tot dat moment gevolgde isolatie-methodes van corticotrophine uit hypophyses. Hier zij slechts in het kort vermeld dat Li c.s. (1943) en Sayers c.s. (1943) ongeveer gelijktijdig een corticotrophine-preparaat bereidden, dat op grond van het gedrag bij electrophorese en ultracentrifuge homogeen genoemd mocht worden. Het moleculair gewicht van deze eiwitten was ca 20.000.

In 1952 isoleerden Astwood c.s. corticotrophine-preparaten, die per gewichtseenheid 100 maal zo actief waren als de zuivere preparaten van Li en Sayers.

Uitgaande van deze Astwood-preparaten zijn er in de afgelopen twee jaar verschillende onderzoekingen verricht om nadere gegevens te verkrijgen omtrent de structuur van het corticotrophine (Landmann c.s. 1953, Li c.s. 1954, White 1954 en Bell c.s. 1954). Deze laatste onderzoekers bereidden uit hypophyseextracten een achttal verschillende eiwitten die alle een hoge corticotrophine activiteit bevatten. Van één van deze eiwitten geven zij de meest waarschijnlijke structuurformule (schema I).

Uit de huidige literatuur is het niet geheel duidelijk of dit het kleinste molecuul is dat een ascorbinezuur depletie geeft.

De tot dusver bekende corticotrophine preparaten werden onderscheiden in A en B preparaten. Door hydrolyse konden uit de A preparaten B preparaten bereid worden. Deze beide preparaten gaven na een intraveneuze injectie bij ratten een gelijke ascorbinezuur depletie van de bijnier. Na subcutane en intramusculaire injectie bleek het A preparaat (Council on Pharmacy and Chemistry 1953) ca 4 maal sterker te zijn.

Volgens de gegevens van White zou asparaginezuur de eindgroep van het B preparaat kunnen zijn. Het B preparaat zou 11 aminozuurresten minder bevatten dan het A preparaat (zie schema I).

Uit het bovenstaande blijkt dat de grootte en/of de samenstelling van een hypophyseeiwit, van invloed kan zijn op de mate waarin het ascorbinezuurgehalte van de bijnier daalt.

De onderzoekingen van Goslings c.s. (1954) geven er een aanwijzing voor dat handels-corticotrophine preparaten niet alleen quantitatief maar ook qualitatief een verschillende werking kunnen hebben. Een speciaal voor experimentele doeleinden bereid corticotrophine preparaat (Res P 277, Organon) werd door de N.V. Organon in de Sayertest (ascorbinezuur depletie van de bijnier) en

SCHEMA I
Structuurformule van corticotrophine
Volgens Bell c.s. 1954:

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-

-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-

-Ala(Gly Glu, Asp)-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-OH

Waarschijnlijk eind-punt van corticotrophine-B (volgens White 1954)

in de bijnierhandhavingstest geijkt. Door Goslings c.s. werd met dit preparaat het effect op de uitscheiding van de 17 ketosteroiden in de 24 uur urine nagegaan. De sterkte van het corticotrophine preparaat volgens de klinisch-biologische- en bijnierhandhavingstest week sterk af van de gevonden waarden in de Sayerstest.

Door Li (1952) worden gelijke waarnemingen beschreven. Deze onderzoeker ziet dat een corticotrophine preparaat volgens verschillende methodes geijkt, niet steeds dezelfde activiteit aangeeft. Bij het ijken van corticotrophine met behulp van de bijnierhandhavingstest wordt het te testen preparaat gedurende 3 of 4 dagen 3 maal daags aan gehypophysectomeerde ratten intraperitoneaal of subcutaan toegediend. Bij het bepalen van het corticotrophinegehalte volgens de Sayerstest wordt slechts een éénmalige intraveneuze injectie van het hormon gegeven. De mogelijkheid bestaat dat de B preparaten sneller geabsorbeerd en omgezet worden en derhalve minder effectief werken in een langdurige test (zoals de gewichtstoename van de bijnier) dan in de één-uurs' Sayerstest (Dixon c.s. 1951). Deze onderzoekers zien dan ook na toevoeging van substanties die de opnamesnelheid van het B preparaat vertraagden een sterkere groei van de bijnieren. Dezelfde groep werkers vond na chromatografie van een corticotrophine preparaat twee fracties die een verschillend effect op de beide bovengenoemde tests hadden. De langzaam lopende fractie had een duidelijk effect op de gewichtstoename van de bijnier en bijna geen activiteit volgens de Sayerstest. Bij de fractie met de grootste loopsnelheid werd een hoge activiteit van de Sayerstest en geen activiteit in bijnier handhavingstest gevonden.

Latere onderzoekingen (Bush) toonden aan dat na toediening aan ratten van de bijniergroei bevorderende fractie, de uitscheiding van de corticosteroiden bij deze dieren niet toenam.

Rinfret (1954) bereidde uit paardenhypophyses een extract dat bij hypophyseloze ratten het bijniergewicht kon handhaven, maar geen ascorbinezuur depletie veroorzaakte.

Na intramusculaire (40 mg/4 dd) en intraveneuze (40 mg/8 h) toediening van dit paardencorticotrophine bij patienten gedurende 6 dagen werd geen verhoogde uitscheiding waargenomen van de 17-hydroxycorticosteroiden in de urine (Liddle 1954).

Voor en na de toediening van dit paardencorticotrophine kregen de patienten een intraveneus infuus van 10 I.U. varkenscorticotrophine.

De stijging van de uitscheiding van de 17-hydroxycorticosteroiden was in de periode na de behandeling van de patienten met paardencorticotrophine ongeveer met 100 % toegenomen.

Uit de bovenstaande recente onderzoekingen mag blijken dat er zeer waarschijnlijk meerdere hypophyse eiwitten zijn die een corticotrophine activiteit bezitten. Deze eiwitten kunnen een qualitatief verschillende invloed op de bijnier hebben.

Aangezien de door ons te beschrijven experimenten met een onzuiver corticotrophine preparaat zijn verricht, moeten wij hier vaststellen dat onze onderzoekingen uitsluitend betrekking hebben op een mengsel van hypophyse eiwit met een bijnierstimulerende werking,

Doelstelling

Het vermogen van de bijnierschors om bepaalde steroiden te produceren is onder meer afhankelijk van het corticotrophine gehalte van het plasma (Hechter 1951). Bij een toestand van „dynamic steady state" zal de hoeveelheid corticotrophine die per tijdseenheid aangevoerd wordt, gelijk moeten zijn aan de hoeveelheid welke in dezelfde tijd verwijderd wordt.

De corticotrophineproductie van de hypophyse bepaalt de aanvoer. In deze inleiding werd reeds gewezen op enkele factoren die deze productie reguleren. Er zijn ons geen gegevens bekend omtrent de synthese van dit eiwit.

Wij hebben getracht nadere gegevens te verkrijgen over het catabolisme (in de ruimste betekenis van het woord) van dit eiwitachtige hormon. Om dit te bestuderen werd corticotrophine met J^{131} gemerkt en bij ratten intraveneus ingespoten; daarna werd de radio-activiteit in verschillende weefsels van deze ratten gemeten. De voordelen van het werken met gemerkt corticotrophine zijn:

1) dat met eenvoudige physische methoden corticotrophine aan te tonen is, terwijl hiervoor anders een omslachtige zuivering en ijkprocedure voor vereist is en
2) dat op deze wijze kleine concentraties aan te tonen zijn, die anders onopgemerkt zouden zijn gebleven.

Een nadeel is, dat zonder aanvullende methodieken het gemerkte corticotrophine niet van eventuele omzettingsproducten te onderscheiden is.

Hoofdstuk II

HET MERKEN VAN EIWITTEN

Inleiding

Het identificeren van eiwitten brengt grote moeilijkheden met zich mee. De ontwikkeling van de zône-electrophorese en ultracentrifuge heeft het analyseren van eiwitmengsels aanzienlijk vereenvoudigd. Het aantonen van een bepaald eiwit kan tot op heden nog het best geschieden op grond van zijn biologische eigenschappen. Zo kunnen eiwitten o.a. geidentificeerd worden met behulp van hun antigene structuur. Eiwitten met een specifiek biologische activiteit, zoals bepaalde hormonen, kunnen uiteraard door deze eigenschap aangetoond worden.

In een aantal gevallen is het mogelijk gebleken, dat eiwitten met eenvoudig te bepalen stoffen gemerkt kunnen worden. Zolang deze merkstof aan het eiwit gebonden blijft, behoeft slechts deze geidentificeerd te worden om de aanwezigheid van het gemerkte eiwit aan te tonen.

Landsteiner en Lamp bestudeerden in 1917 een aantal eiwitten waaraan via een diazobrug verschillende andere groepen gebonden waren. Door koppeling van het colorimetrisch te bepalen bis-diazobenzidine aan albumine, konden Heidelberger c.s. (1933) dit eiwit uit antigeen-antilichaambindingen quantitatief bepalen. In navolging van deze onderzoekers bereidde Marrach (1934) een gemerkt anti-typhoid serum. Coons c.s. (1942) beschreven een methode om fluoresceine aan antilichamen te binden. Met behulp van de door hen beschreven techniek, localiseerde deze groep van onderzoekers histochemisch verschillende bacteriele en virusantigenen in weefselcoupes (Coons c.s. 1950a, Kaplan c.s. 1950, Coons c.s. 1950b, Hill c.s. 1950). Met het beschikbaar komen van isotopen voor biologische en medische onderzoekingen, werden nieuwe mogelijkheden geschapen om eiwitten te merken.

Door het volgen van het isotoop kunnen de lotgevallen van het gemerkte eiwit bestudeerd worden. Insuline was het eerste hormon met een eiwitachtige structuur dat met een radioactief isotoop gemerkt werd (Reiner c.s. 1942).

Sonenberg c.s. (1951a) en Ferrebee c.s. (1951) merkten corticotrophine met J^{131}.

In navolging van deze onderzoekers maakten wij bij de bestudering van het metabolisme van corticotrophine, gebruik van corticotrophine waaraan dit radioactieve isotoop gebonden is. Het merken van corticotrophine met J^{131} is mogelijk op grond van de waarnemingen van Böhm (1876).

Met de isolatie van 3-5-diiodotyrosine uit een natuurlijk voorkomend iodoproteine (Wheeler c.s. 1905, Henze 1907) en uit kunstmatig gejodeerde eiwitten (Oswald 1910, 1911) was bewezen, dat het in eiwitten voorkomende tyrosine, jodium kan binden.

Pauly (1910) ontdekte, dat jodium aan de imidazolring van histidine gebonden kan worden. Bij krachtige jodering van een eiwit

worden cystine en tryptophaan geoxideerd. Bij deze reactie van cystine met jodium komt zwavel vrij en worden jodoform en HJ gevormd (Blum en Strauss, 1921). Deze laatste onderzoekers toonden aan, dat bij een snelle en kortdurende jodering deze nevenreacties niet optreden, evenmin als de jodering in de imidazolring van histidine.

Om zo min mogelijk omzettingen binnen een eiwit teweeg te brengen, zal men steeds aan een jodering onder zeer milde condities de voorkeur geven.

Methodiek

A. Het merken en dialyseren

Bij het merken van corticotrophine met radioactief jodium volgden wij de door Pressman c.s. (1950a) beschreven methode voor jodering van antilichamen. Hierbij werden 100 I.U. (= 74 mg) corticotrophine (batch 37, Organon N.V.) of maximaal 100 mg albumine, globuline of ovalbumine in 2 ml boraatbuffer pH8 opgelost. Hieraan werden toegevoegd 0,1 ml 0,01 M KJ, ca 4 millicurie J^{131}, dat minder dan 0,1 ml van een 0,01 M $KMnO_3$ aan reducerende stoffen bevatte, 1 druppel 1 M $NaNO_2$ en 0,2 ml 2,5N HCl. Na equilibratie van deze oplossing gedurende ongeveer 5 minuten, werd door toevoeging van 2,5N NaOH de pH weer op 8 gebracht. De pH werd gecontroleerd met pH-papier (oxyphen). Ongeveer 20 minuten later werd de verkregen vloeistof in een 10 cm lange dialysebuis met een doorsnede van 2 cm overgegoten. Er werd minimaal 48 uur gedialyseerd bij 4° C tegen 3 l 0,9 % NaCl. De dialyse vloeistof werd minstens vier maal ververst. De gebruikte boraatbuffer was samengesteld uit 0,16N NaOH, 0,2M H_3BO_3 en 0,16M NaCl. Uit tabel I blijkt, dat het grootste percentage radioactieve stof reeds in de eerste portie dialyse vloeistof teruggevonden wordt.

B. Specifieke activiteit van de gemerkte eiwitten

Bij het door ons toegepaste principe van merken, wordt een voor ons doel voldoende actief preparaat verkregen. Met onze manier van tellen (hoofdstuk III, methodiek) registreerden wij per I.U. corticotrophine 30.000 tot 90.000 c.p.m.

Van enkele preparaten werd berekend hoeveel procent van het J^{131}, dat voor het merken gebruikt werd, na dialyseren achterbleef (tabel II). De dialyse rest werd met 10 % trichloorazijnzuur (t.c.a.) behandeld. Van de corticotrophine preparaten 1, 2 en 3, (tabel II) was de J^{131} activiteit in de trichloorazijnzuur praecipitabele fractie resp. 86, 87 en 92 % van de totale activiteit die zich in de dialyse rest bevond.

Bij het bepalen van J^{127} in drie afzonderlijk gemerkte en gedialyseerde corticotrophine preparaten, bleken deze per 100 I.U. (= 78 mg) te bevatten resp. 50 µg, 40 µg en 42,5 µg totaal J^{127} waarvan resp. 48 µg, 39 µg en 39 µg aan eiwit gebonden waren. Het verschil van de gevonden hoeveelheden totaal en gebonden J^{127} van eenzelfde preparaat liggen binnen de bepalingsfout.

Opgemerkt zij hierbij dat de eiwitten bij deze laatste methode

TABEL I

Teruggevonden radioactiviteit in de eerste en laatste portie van het dialysaat (% van de totaal in de dialyse-vloeistof teruggevonden radioactiviteit).

Bij bereiding van met J^{131} gemerkt:	Eerste portie: %	Laatste portie: %
corticotrophine	93	0, 9
"	97	0, 0
"	99	0, 0
"	92	0, 9
"	96	0, 1
"	95	0, 0
albumine	93	0, 7
"	99	0, 0
"	97	0, 1
"	98	0, 0.

Radioactivity in the first and final dialysate. (Radioactivity expressed as % of the total recovered radioactivity in the dialysate).

neergeslagen werden met een Somogyi-oplossing (16 ml 0.05 M $ZnSO_4$ en 2 ml 0.75 N NaOH). Daarna werd dit neerslag achtereenvolgens 3 maal gecentrifugeerd en gewassen. Er lijkt een discrepantie te bestaan tussen het percentage organisch gebonden J^{127} in een gejodeerd corticotrophine monster en het percentage t. c. a. praecipitabele J^{131} van een gemerkt corticotrophine preparaat; immers de gebonden hoeveelheid J^{131} varieerde van 78 tot 99 % en J^{127} van 92 tot 98 % van het totale J gehalte. Naar deze discrepantie werd geen uitgebreid onderzoek ingesteld, omdat de resultaten van onze experimenten hierdoor niet principieel beinvloed werden (vide infra). Wel bleek dat de hoeveelheid radioactiviteit in het plasmapraecipitaat steeg van 82 tot 90 % indien wij tevoren een hoeveelheid eiwit als carrier aan het corticotrophine toevoegden.

Volgens de laatste gegevens (Bell c. s. 1954) kan het moleculair gewicht van varkenscorticotrophine op 4566 gesteld worden. Een zuiver preparaat bevat ca 100 I. U. per mg. Naar schatting moet dus worden verondersteld dat in de 78 mg (= 100 I. U.) van het corticotrophine preparaat 1 mg = 0,22 µg mol. zuiver corticotrophine voorkomt. De rest bestaat uit eiwit waarmede het gebruikte preparaat verontreinigd is. Het is dus moeilijk een schatting te maken hoeveel J atomen per molecuul corticotrophine gebonden zijn. Is het jodium over het gehele eiwitmengsel gelijkelijk gedistribueerd, dan betekent dit dat 1/78ste deel van het J aan het zuivere corticotrophine zit, hetgeen betekent dat 1 J-atoom per 40 moleculen corticotrophine gebonden is. Een andere mogelijk-

TABEL II

Radioactiviteit in het trichloorazijnzuur praecipitaat (t.c.a.), in de bovenstaande vloeistof en in de totale dialyse rest. (Radioactiviteit uitgedrukt als % activiteit van uitgangsmateriaal).

No:	Preparaat:	t.c.a.: %	Bovenstaande vloeistof: %	Totaal: %
1	corticotrophine	13,8	2,2	16
2	"	10,5	3	13,5
3	"	21,6	1,9	23,5
4	albumine	18,5	2	20,5
5	"	32,5	0,5	33

Radioactivity in the trichloracetic acid precipitate (t.c.a.) in the supernatant and in the total non-dialysable material. (Radioactivity expressed as % of the initial I^{131}).

heid zou zijn dat er geen J aan corticotrophine gebonden is en alles aan het onwerkzame eiwit. Een derde mogelijkheid zou zijn, dat alleen aan het corticotrophine het J gebonden is. In dat geval zou elk corticotrophine molecuul 2 atomen J bevatten.

C. Test op de biologische activiteit van het gemerkte corticotrophine

Selye (1950) beschrijft dat bij een verhoogde bijnieractiviteit het thymusgewicht van ratten sterk afneemt. Bruce c.s. (1952) zien dit effect na toediening van corticotrophine. In enkele orienterende experimenten maakten wij van deze eigenschap van corticotrophine gebruik om na te gaan of de hormonale activiteit na het merken en dialyseren van dit hormon niet vernietigd was. Hiertoe dienden wij aan een aantal ratten van ca 45 g gejodeerd en niet gejodeerd corticotrophine toe.

Als controle dienden ratten die met physiologisch zout werden ingespoten en ratten waaraan het ongejodeerde corticotrophine werd toegediend.

Experiment: 2 x 2 I.U./dd. volgens de hierboven beschreven methode gejodeerd corticotrophine, 2 x 2 I.U./dd ongejodeerd corticotrophine en 2 x 0.2 ml 0.9 % NaCl werden gedurende 5 dagen i.m. aan resp. 5, 6 en 7 groot Wistar ratten (mnl) toegediend. Het gewicht van de ratten varieerde tussen de 40 en 50 gram.
Op de vijfde dag werden de proefdieren met chloroform gedood en werd de thymus vrijgeprepareerd en op de torsiebalans gewogen.
Dit experiment werd nogmaals herhaald volgens de onderstaande proefopstelling.

Aantal ratten	Dosis
6	2 x 1 I. U. gejod. cortic.
5	2 x 2 I. U. gejod. cortic.
6	2 x 1 I. U. corticotrophine
6	2 x 2 I. U. corticotrophine
5	2 x 0,2 ml 0. 9% NaCl

TABEL III

Thymusgewichten van ratten (40 - 50 g) op de 5e dag na intramusculaire injectie van 0,9% NaCl, corticotrophine en gejodeerd corticotrophine.

Groep:	Preparaat:	Dosis d. d. :	Aantal dieren per groep	gew. thymus ± s. e.
I	corticotrophine*	2 x 2 I. U.	5	127 ± 13
II	corticotrophine	2 x 2 I. U.	6	152 ± 11
III	NaCl	2 x 0,2 ml	7	205 ± 14
IV	NaCl	2 x 0,2 ml	5	172 ± 15
V	corticotrophine*	2 x 1 I. U.	6	144 ± 19
VI	"	2 x 2 I. U.	5	78 ± 9
VII	corticotrophine	2 x 1 I. U.	6	136 ± 16
VIII	"	2 x 2 I. U.	6	90 ± 15

Gewicht thymus
I en III - 0,01 > p > 0,001
II en III - 0,02 > p > 0,01
I en II - 0,2 > p > 0,1
IV en V - 0,2 > p > 0,2
IV en VI - 0,001 > p
IV en VII - 0,2 > p > 0,1
IV en VIII - 0,01 > p > 0,001
VI en VIII - 0,6 > p > 0,5
V en VII - 0,8 > p > 0,7

Thymus weight of rats (40 - 50 g) the fifth day after intramuscular injection of 0,9% NaCl, corticotrophin and labelled corticotrophin.

Zoals uit tabel III blijkt was de gewichtsdaling van de thymus van de met 2 x 2 I. U. corticotrophine per dag behandelde groepen significant t.o.v. die der controle groepen. Er werd geen verschil in thymusgewicht waargenomen bij groepen, die dezelfde dosis gejodeerd dan wel niet gejodeerd corticotrophine toegediend kregen. Hieruit blijkt dus dat door het joderen de eigenschap van corticotrophine om het thymusgewicht te doen afnemen, niet vernietigd wordt. In hoeverre deze eigenschap quantitatief behouden blijft, valt uit het hier beschreven experiment niet af te leiden.

Discussie

De hierboven beschreven methode om eiwitten te merken met J^{131} is op ruime schaal door Pressman c.s. (1949, 1950) toegepast bij het merken van anti-weefselantilichamen. Na het joderen blijven de specifieke eigenschappen van deze antilichamen behouden.

Eisen en Keston (1949) merkten op ongeveer gelijke wijze bovine serum albumine met J^{131}. Antilichamen bereid tegen dit gejodeerde serum albumine dan wel tegen het uitgangsproduct gaven met het gejodeerde serum albumine quantitatief gelijke hoeveelheden praecipitaat.

Het verdwijnen van bepaalde aan een eiwit gebonden eigenschappen en het verschijnen van andere, is na jodering van deze eiwitten door een aantal onderzoekers aangetoond (Obermayer c.s. 1906, Wormall 1930). Hierbij blijkt van belang te zijn hoeveel jodium atomen per molecuul eiwit gebonden worden.

In 1943 onderzocht Shahrokh de antigene eigenschappen van kristallijn paarden albumine. In dit zuivere albumine werden verschillende percentages jodium ingevoerd. Praecipitatie van dit gejodeerde albumine met antilichamen tegen paarden serum albumine is afhankelijk van de sterkte van jodering van het uitgangsproduct. Naarmate het daarin voorkomend percentage jodium hoger ligt, is de hoeveelheid praecipitaat minder.

Indien meer dan honderd jodium atomen aan een molecuul pseudoglobuline worden gebonden, verdwijnt de species-specifieke activiteit van dit eiwit (Kleczkowski 1940, Haurowitz c.s. 1941). Na invoering van ongeveer 13 atomen J per antilichaam-molecuul (aangenomen dat het moleculair gewicht hiervan 168.000 is) zien Francis c.s. (1951) na toevoeging van antigeen geen verandering in het N-gehalte van het ontstane praecipitaat.

Volgens Li c.s. (1946) zou bij toenemende jodium opname van corticotrophine, de biologische activiteit van dit hormon verminderen.

Ferrebee c.s. (1951) jodeerden globuline, insuline en corticotrophine met een methode welke vrijwel overeenkomt met de door ons gevolgde. Deze drie eiwitten behielden allen hun specifieke biologische activiteit. Aan insuline waren circa 2 jodium atomen per molecuul gebonden. Het gemerkte corticotrophine bevatte een gelijke hoeveelheid J^{131} als het bestudeerde insuline.

Het door Ferrebee gebruikte corticotrophine preparaat was twintigmaal zo sterk als het toen gebruikte standaard preparaat LA-I-A van Armour Inc. (De door ons gebruikte corticotrophine preparaten bevatten per 0.74 mg één I.U.).

Bij een even sterke jodering van alle eiwitten die in de corticotrophine preparaten aanwezig zijn, zal het tot dusverre bekende kleinste gedeelte dat de specifiek biologische eigenschappen bezit, gejodeerd kunnen worden. De vraag rijst hier echter in hoeverre de componenten waaruit onzuivere eiwitten als onze corticotrophine preparaten zijn opgebouwd, gelijkelijk gejodeerd kunnen worden. Pressman c.s. (1950) kon aantonen, dat de componenten van een eiwitmengsel zoals serum, met verschillende snelheden gejodeerd worden.

Op grond van het hier beschrevene, is niet vast te stellen in welke mate het actieve gedeelte van het corticotrophine preparaat

gejodeerd is. De door Ferrebee gevonden ascorbinezuur-daling van de bijnier na injectie van gejodeerd corticotrophine en de door ons vastgestelde thymusinvolutie (tabel III) is zeer wel mogelijk toe te schrijven aan werkzame bestanddelen die aan het joderingsproces niet deelgenomen hebben.

Het behoud van de biologische eigenschappen van corticotrophine preparaten na jodering behoeft dus op zich zelf niets te zeggen omtrent de mate waarin het specifiek actieve deel van dit eiwitmengsel zijn hormonale werking wijzigt na het invoeren van jodium atomen. Hierop komen wij in het volgende hoofdstuk terug.

Hoofdstuk III

HET VERDELINGSPATROON VAN GEMERKTE EIWITTEN BIJ RATTEN 20 MIN. NA DE INJECTIE

Inleiding

Het is een open vraag wat er met het corticotrophine dat in de circulatie komt, gebeurt. In de literatuur zijn aanwijzingen te vinden welke er op duiden, dat de bijdrage van de bijnier tot de eliminatie van het corticotrophine uit de bloedbaan gering is.
1) De door Greenspan c. s. (1950) bij bijnierhoudende ratten bepaalde halveringstijd van intraveneus toegediend heteroloog corticotrophine (5 5 min.) verschilt niet met de door Gemzell c. s. (1951) gevonden waarden bij bijnierloze ratten (5 min.). Soortgelijke waarnemingen ten aanzien van homoloog corticotrophine werden verricht door Sydnor c. s. (1953b). Bij ratten waarbij twee weken te voren bilaterale adrenalectomie werd verricht, werd door hen de bloedconcentratie van corticotrophine gemeten op verschillende tijden na hypophysectomie. De halveringstijd van dit endogeen corticotrophine bedroeg ruim 1 minuut. Dit komt overeen met de in hetzelfde instituut gemeten halveringstijd (2 min.) van rattencorticotrophine toegediend aan bijnier- en hypophysehoudende ratten.

De helling van de verkregen eliminatie curve van endogeen geproduceerd corticotrophine uit het bloed is steiler dan die welke Greenspan en Gemzell voor soortvreemd corticotrophine bepaalden. De aanwezigheid van de bijnieren schijnt hierop van weinig invloed te zijn.
2) Door Wijnans (1952) werd de consumptie van corticotrophine bestudeerd. Onder consumptie verstaat deze onderzoeker het specifiek onttrekken van hormon aan de circulatie door de effector-organen. Het bijniergewicht en het ascorbinezuurgehalte van dit orgaan werden als criteria voor het verbruik van corticotrophine door de bijnier, aangelegd.

De bijniergewichten van hypophyseloze infantiele ratten met één resp. twee bijnieren verschilden na toediening van één kleine dosis dan wel frequent toegediende hogere doses, niet. Evenmin werd na toediening van soortvreemd corticotrophine verschil gezien in het ascorbinezuurgehalte van hypophyseloze, geëviscereerde nierloze ratten met één of twee bijnieren.

Wijnans vindt dan ook geen argumenten, die voor een consumptie van corticotrophine door de bijnier pleiten. Deze conclusie is in overeenstemming met de waarnemingen van Ganong (1954). Deze onderzoeker zag na toediening van gelijke doses corticotrophine aan gehypophysectomeerde ratten met één dan wel twee bijnieren, dezelfde gewichtstoename per 100 mg bijnierweefsel.

Tot dusverre werd behalve uit het bloed, ook uit de nier en bijnier corticotrophine geëxtraheerd en biologisch aangetoond (Richards en Sayers 1951). Deze onderzoekers vonden bij ratten, vijf minuten na intraveneuze injectie van 100 µg rattencorticotro-

phine 40 µg terug in de extracellulaire vloeistof, 20 µg in de nier 0,2 µg in de bijnier, terwijl de lever minder dan 1 µg bevatte. Twintig minuten na de injectie waren deze getallen voor de extracellulaire vloeistof, nier, bijnier en lever resp. minder dan 4 µg, 15 µg, 0,05 µg en minder dan 1 µg. Er kon geen uitscheiding in de urine aangetoond worden. Rattencorticotrophine gedurende één uur bij 37°C in rattenplasma geincubeerd, behield zijn biologische activiteit.

Na toediening van met J^{131} gemerkt corticotrophine werd door Sonenberg (1951a) radioactiviteit teruggevonden in de bijnier, het bloed, de lever, milt en nier.

Uit de door hem weergegeven curves blijkt, dat na injectie van resp. gemerkt corticotrophine, gemerkt albumine en J^{131} de verdwijningssnelheid uit het bloed geen verschil laat zien. Dit zelfde geldt ten aanzien van de concentratie van de radioactiviteit in de lever.

De eerste twee uur na de injectie worden in de spier gelijke percentages van de ingespoten doses van deze drie preparaten teruggevonden. In de schildklier vindt Sonenberg gedurende een periode van twee uur gelijke concentraties na toediening van gemerkt corticotrophine en J^{131}; voor gemerkt albumine ligt het percentage in dit orgaan veel lager. Na injectie van gemerkt corticotrophine worden de eerste 15 minuten na de injecties hogere concentraties in de bijnier gevonden dan na de injectie van albumine* of J*.

In een later verschenen publicatie (Sonenberg 1951b) blijkt naar onze mening uit de vermelde getallen, dat gemerkt prolactine een minstens even grote affiniteit voor de bijnier heeft als corticotrophine. Vergelijken wij het percentage activiteit per gram bijnier zowel na injectie van gemerkt prolactine als na toediening van gemerkt corticotrophine, dan is de concentratie welke werd waargenomen na injectie van gemerkt prolactine te groot om verklaard te worden door een verontreiniging van dit hormon met corticotrophine. Sonenberg vermeldt in deze publicatie dat bovine serum albumine, evenals corticotrophine, in de nier geconcentreerd wordt; dit is in tegenspraak met zijn vroegere mededelingen, waarnaar door hem verwezen wordt.

De hierna te beschrijven experimenten werden verricht om gegevens te verkrijgen over de verdeling van soortvreemd corticotrophine in het organisme. Dit werd vergeleken met het verdelingspatroon van andere met J^{131} gemerkte eiwitten.

Methodiek

De in deze experimenten gebruikte ratten (150 - 200 gram, stam Groot Wistar) kregen een urethaan-aether narcose (urethaan 1 g per kg lichaamsgewicht subcutaan ingespoten). De te onderzoeken stof werd in de vena femoralis ingespoten. In het experiment waarbij geadrenalectomizeerde ratten gebruikt werden geschiedde de adrenalectomie volgens Ingle (1949).

Getest werden de onder preparaten genoemde eiwitten, welke met J^{131} werden gemerkt als beschreven is in hoofdstuk II. Bloedmonsters werden 1, 5, 10, 15 en 20 minuten na de injectie

uit de staart afgenomen en in steeds dezelfde leucocytenpipet opgezogen. Deze werden met enkele druppels aqua destillata op aluminium plaatjes gebracht en vervolgens aan de lucht gedroogd. De radioactiviteit van het achterblijvende residu werd gemeten door het plaatje onder een door lood afgeschermde end-window β-teller met een efficientie van ongeveer 10 % te plaatsen.

De ratten werden 20 minuten na injectie gedood door decapitatie of verbloeding uit de vena cava na heparinisatie.

1 ml bloed werd met aqua dest. tot 10 ml aangevuld en gemeten in de vloeistofteller volgens Veal (1948). De diverse organen werden steeds in dezelfde volgorde vrijgeprepareerd, op een torsiebalans gewogen en opgelost door koken in 3 ml ± 40 gew. % KOH. De alcalische oplossingen werden geneutraliseerd met sterk HCl en met aqua dest. aangevuld tot een volume, dat gelijk was aan de inhoud van de vloeistofteller. Deze voor β+γ-deeltjes gevoelige buis heeft een efficientie van ongeveer 0, 5 %. De gevonden tellingen van de radioactiviteit werden volgens de gebruikelijke statistische criteria beoordeeld. Een correctie werd aangebracht voor het aanwezige natuurlijk radioactief isotoop van Kalium (± 0, 001 % van het totaal Kalium).

Alle gegevens over gevonden radioactiviteit zijn uitgedrukt als het aantal tikken per minuut (counts per minute), per gram weefsel, ml bloed of totale schildklier. Statistische analyse vond plaats volgens Fisher (1950).

De orgaan/bloed ratio's zijn berekend als het quotient van het aantal c.p.m. per gram weefsel of totale schildklier en het aantal c.p.m. per gram bloed. Voor het berekenen van het aantal counts per gram bloed werd voor bloed een S.G. van 1, 054 aangenomen. De gevonden radioactiviteit van de bloedmonsters welke op verschillende tijden na de injectie werden afgenomen uit de staart, is uitgedrukt als percentage van de 20' waarde. De verdwijningssnelheid uit het bloed gedurende de eerste 20 minuten na de injectie van corticotrophine werd berekend uit 5 waarnemingen, elk gedaan met 5 ratten met afzonderlijk gemerkte corticotrophine preparaten.

De bovine serum albumine* en J^{131} waarden werden verkregen uit resp. 3 en 4 experimenten met 5 waarnemingen per experiment. De resultaten welke werden verkregen met de overige gemerkte preparaten werden uitgedrukt als gemiddelde van 5 waarnemingen.

Preparaten

Het gebruikte corticotrophine preparaat is het „Cortrophine Organon" ch. 37. 1 mg van dit preparaat heeft een activiteit van 1,35 I.U.

Het albumine, ovalbumine en levereiwit zijn alle handelspreparaten. Het albumine is het bovine serum albumine „Poviet". Het leverpreparaat is een ontvet en bij 37° C gedroogd leverpoeder „Viobin" batch L.P. 40-51. Het humaan serum globuline was afkomstig van de Nederlandse bloedtransfusiedienst.

Het spiereiwit werd bereid door 100 g in de Latapiemincer gemalen kalfsvlees in 200 ml aqua dest. te extraheren. Aan dit

mengsel werd na 3 uur mechanisch roeren 700 mg NaCl toegevoegd. 18 uur later werd het mengsel door gaas gefiltreerd. Aan het filtraat werd aceton van 4° C toegevoegd tot een concentratie van 40 %. Dit mengsel werd bij 0° C gecentrifugeerd. Aan de bovenstaande heldere vloeistof werd aceton tot een concentratie van 75 % toegevoegd. Het na centrifugeren verkregen praecipitaat werd in aceton gesuspendeerd, vervolgens weer gecentrifugeerd, waarna het praecipitaat met stikstof werd drooggeblazen.

Uit een mensen-placenta werd een eiwit bereid met dezelfde methodiek als hierboven voor het bereiden van het spiereiwit is beschreven.

De overige hypophyse preparaten waren twee corticotrophine preparaten gezuiverd volgens Astwood (1951). Deze preparaten COC 146 en 7467 bevatten resp. per mg 12,5 en 18 I.U. corticotrophine. De ruwe nevenfractie (het zgn. B-preparaat) werd verkregen uit de 90 %-ige zure aceton moederloog van de hoofdfractie, verkregen na extractie van varkenshypophyses volgens Lyons (1937). Door het neutraliseren van deze zure moederloog sloeg de bewuste fractie neer. Uiteraard heeft dit materiaal niets van doen met corticotrophine B. De activiteit van dit preparaat is 0,25 I.U. per mg.

Verder werd gebruik gemaakt van een hormonaal onwerkzame fractie 4903/I, die afkomstig was van een COC-zuivering van een ruw corticotrophine (no. 4903-I) en bestaat uit de moederloog, resterende na adsorptie van het actieve materiaal aan het carboxycellulose. Deze moederloog werd gelyophiliseerd. De corticotrophine activiteit van dit preparaat is minder dan 0,3 I.U. per mg.

Resultaten

Zoals uit figuur I blijkt is de J^{131} activiteit in het bloed 15 minuten na toediening van gemerkt corticotrophine 1/3 van de één minuut waarde.

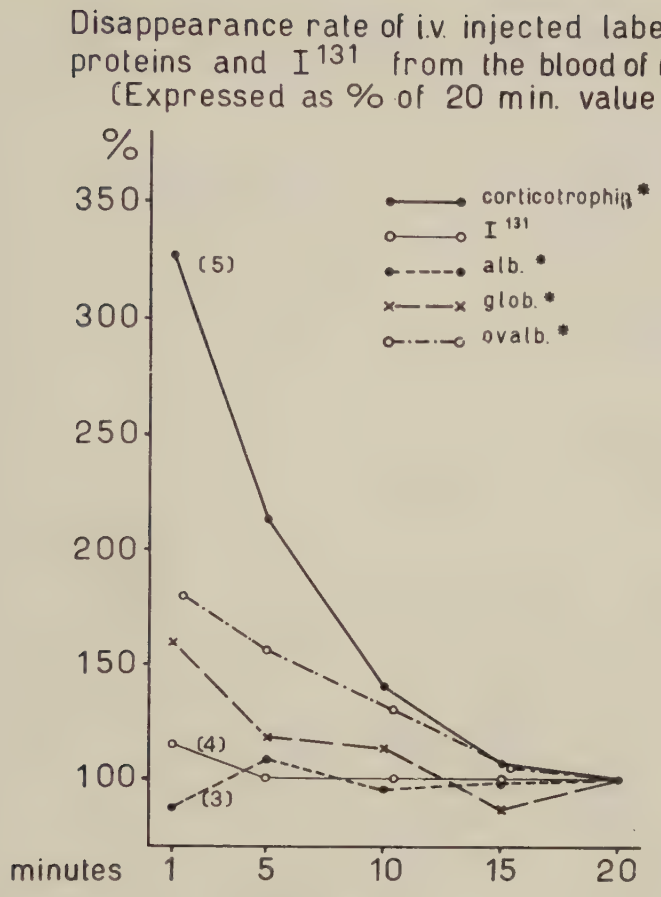
In tegenstelling tot de bloedconcentraties na injectie van gemerkt corticotrophine, veranderen deze de eerste 20 minuten na toediening van albumine* en J* niet.

Figuur II laat zien, dat de bloedconcentraties van de twee verschillende toegediende corticotrophine preparaten COC* en ch 37* en de ruwe nevenfractie B* en van de gemerkte inactieve hypophyse fractie met dezelfde snelheid afnemen. Het verschil in bloedactiviteit tussen het COC*-preparaat en de overige preparaten één minuut na de injectie, is niet significant.

Bij de preparaten waarvan de bloedconcentratie de eerste twintig minuten na de injectie niet afneemt, blijkt de radioactiviteit die in de organen teruggevonden wordt zeer gering te zijn, vergeleken met de nog in de bloedbaan aanwezige hoeveelheden (tabel IV en V).

Na injectie van globuline* en ovalbumine*, dalen de over dezelfde tijd gemeten bloedconcentraties met maximaal 50 %. Hierbij werd een bloed/lever ratio van 3 tot 4 en een bloed/nier ratio van 1 tot 3 gevonden.

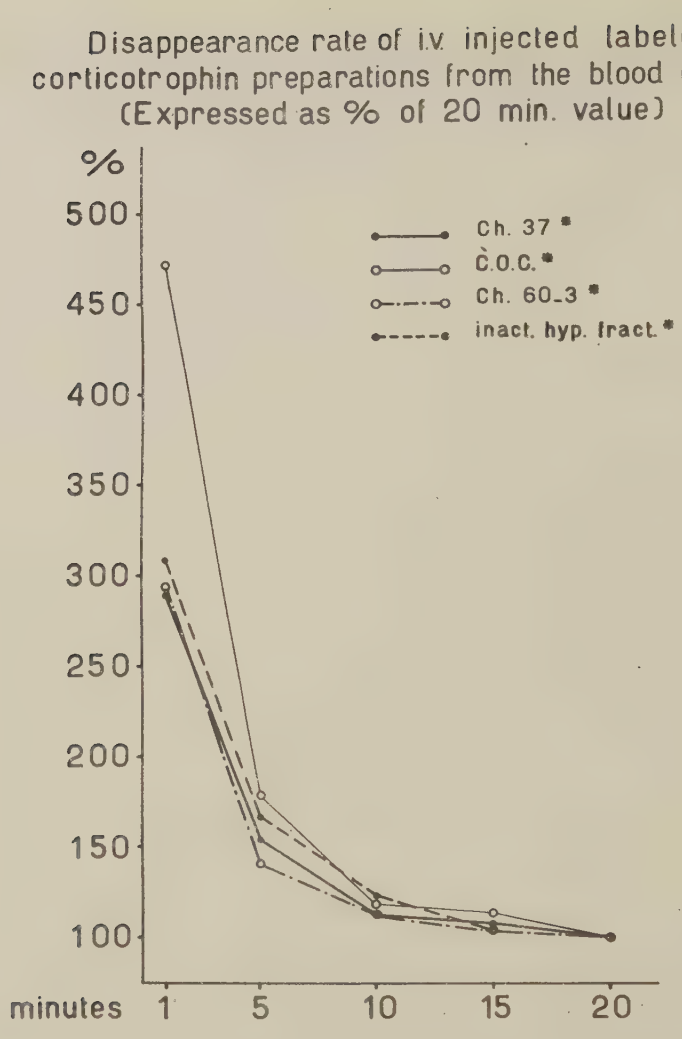
Uit deze gegevens blijkt, dat in tegenstelling tot de andere ge-



Figuur I

Verdwijningssnelheid van intraveneus toegediende gemerkte eiwitten en J^{131} uit het bloed van ratten. (De getallen zijn uitgedrukt als percentage van de twintig minuten na de injectie gevonden waarden).

teste eiwitten, de uit de hypophyse afkomstige proteinen 20' na de injectie in sterke mate in de nier geconcentreerd zijn. Het gemerkte placenta-eiwit neemt in deze een afzonderlijke plaats in. De nier/bloed ratio na injectie van dit eiwit is 2,74; terwijl 9, 5 % van de ingespoten dosis 20' na de injectie in de nier aanwezig is. Het placenta-eiwit wordt dus evenals de hypophyse proteinen in sterke mate door de nier opgenomen. De lever/bloed ratio 20 minuten na toediening van gemerkt corticotrophine ch. 37 verschilt niet met de op dezelfde tijd gevonden waarde voor humaan globuline en ovalbumine. Twintig minuten na toediening van J* is de activiteit in de schildklier het hoogst. De ratio totale schildklier/ bloed na toediening van met J^{131} gemerkte eiwitten en na injectie van J* verschilt significant ($p < 0,001$). De nier/bloed ratio 5 en 20 minuten na toediening van gemerkt corticotrophine aan bijnierloze dan wel bijnierhoudende ratten, verschilt niet (tabel VI).



Figuur II

Verdwijningssnelheid van intraveneus toegediende gemerkte corticotrophine preparaten uit het bloed van ratten. (De getallen zijn uitgedrukt als percentage van de twintig minuten na de injectie gevonden waarden).

Discussie

De concentratie in het bloed 20 minuten na injectie van gemerkt corticotrophine is één derde van de na één minuut gemeten waarde, terwijl de bloedconcentratie de eerste twintig minuten na injectie van J* ongeveer constant blijft (fig. I).

Uit tabel 3 bleek, dat de gemerkte eiwitten na dialyse nog steeds met een geringe hoeveelheid jodiden verontreinigd waren.

Aangezien wij slechts de J^{131} activiteit meten, is de weergegeven verdwijningscurve van gemerkt corticotrophine dus tot stand

TABEL IV

Verdeling over verschillende organen van J^{131} activiteit 20 minuten na intraveneuze injectie van gemerkte eiwitten en J^{131}. (Getallen uitgedrukt als c.p.m. per gram weefsel, totale schildklier en per ml bloed).

Preparaat	Ingespoten dosis c.p.m.	c.p.m./g bijnier 1) ± s.e.	c.p.m./g nier 1) ± s.e.	c.p.m./g lever 1) ± s.e.	c.p.m./g spier 1) ± s.e.	c.p.m./totaal schildklier 1) ± s.e.	bloed 1) c.p.m./1 ml ± s.e.
corticotrophine*	199.250	2625±166	29895±2110	8180±600	455±44	725±86	2706±99
"	164.300	1490±140	23460±640	4030±152	185±28	527±27	1752±178
"	298.750	3080±158	29990±3900	6720±890	297±86	1355±198	3550±126
"	440.150	2540±496	52875±2850	6445±477	520±51	706±78	3528±259
"	428.000		58520±2320				3606±195
"	229.250		29800±3280				2767±66
C.O.C.*			6780±550				920±59
corticotrophine*	467.450	3880±890	52580±5410	18360±1550		663±124	3962±317
C.O.C.* 7467	85.200	530±20	9570±738	1970±97		187±37	716±30
B. prep.* 60-3	83.250	2660±546	3880±211	4060±302		162±15	605±25
Horm. onwerkz. hyp. fractie* 4903/1	136.900	1620±218	15620±1320	7590±2270		182±22	1201±72
Bov. ser. alb.*	204.500	4950±174	4205±254	2900±190	460±25	998±152	17790±740
" *	419.500	7270±498	7075±506	4870±338	941±58	2160±192	28200±630
" *	599.500	13280±860	13820±540	11075±430	1410±66	3685±287	32388±620
Globuline *	516.650	3150±960	4990±288	15225±1130	251±25	991±129	4775±314
Ovalb. *	145.500	1490±201	4030±450	8660±456	246±90	648±113	2403±166
" *	166.900		5040±358	7170±354			1737±49
Levereiwit*	280.000		1640±41	2080±56			1214±41
Spiereiwit*	54.400		2496±58				876±32
Placenta eiwit*	307.000		29010±1350				10044±361
J*	215.000	640±173	5125±185	770±45	305±35	6895±1450	1321±123
J*	93.850	1318±195	894±36	592±39	327±43	1589±109	1566±155
J*	21.300	138±20	55±20	55±28		1279±116	363±32

Distribution of I^{131} in different tissues 20 minutes after an intravenous injection of labelled proteïns and I^{131} (results expressed as c.p.m./g tissue, total thyroid and ml blood).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.

TABEL V

Orgaan/bloed ratio s van J^{131} activiteit 20 min. na intraveneuze injectie van gemerkte eiwitten en J^{131} (getallen uitgedrukt als ratio's van gram orgaan/gram bloed of totale schildklier/gram bloed).

Preparaat	Ingespoten dosis c.p.m.	bijnier (g)/ bloed (g) 1) ± s.e.	nier (g)/ bloed (g) 1) ± s.e.	lever (g)/ bloed (g) 1) ± s.e.	spier (g)/ bloed (g) 1) ± s.e.	schildklier 1) totaal/bloed (g) ± s.e.
corticotrophine*	199.250	0,92±0,07	10,41±0,73	2,84±0,05	0,16±0,02	0,25±0,03
"	164.300	0,82±0,07	13,19±1,12	2,28±0,22	0,11±0,02	0,30±0,03
"	298.750	0,83±0,03	7,94±0,79	1,84±0,84	0,08±0,02	0,36±0,04
"	440.150	0,69±0,04	14,49±1,11	1,75±0,08	0,14±0,02	0,19±0,02
"	428.000		15,5 ±0,04			
"	229.250		10,8 ±0,15			
C. O. C.* 146			7,36±0,35			
corticotrophine*	467.450	0,96±0,19	13,29±0,92	4,59±0,60		0,16±0,02
C. O. C.* 7467	85.200	0,77±0,05	13,80±0,66	2,83±0,09		0,27±0,06
B. prep.* 60-3	83.250	4,63±1,19	6,41±0,27	6,77±0,50		0,27±0,02
Onwerkzame hypophyse fractie* 4903/I	136.900	1,33±0,15	13,15±1,21	6,37±2,01		0,15±0,02
Alb. bov. ser.*	204.500	0,27±0,01	0,23±0,02	0,16±0,01	0,03±0,04	0,05
"	419.500	0,25±0,02	0,24±0,02	0,16±0,01	0,03	0,07
"	599.500	0,40±0,04	0,42±0,04	0,30±0,03	0,04	0,10
Hum. glob.*	516.650	0,69±0,27	1,02±0,10	3,08±0,26	0,05	0,20
Ovalb.*	145.500	0,64±0,07	1,74±0,19	4,04±0,71	0,11±0,02	0,33±0,09
" *	166.900		2,79±0,24	3,94±0,21		
Levereiwit*	280.000		1,20±0,06	1,64±0,07		
Spiereiwit*	54.400		2,75±0,17			
Placenta eiwit*	307.500		2,74±0,08			
J*	215.000	0,46±0,10	0,84±0,15	0,59±0,10	0,23±0,04	5,03±0,95
J*	93.850	0,79±0,09	0,56±0,04	0,37±0,04	0,20±0,01	1,03±0,17
J*	21.300	0,00	0,37±0,07	0,15±0,09	0,00	3,52±0,54

Tissue-blood distribution ratio of I^{131} 20 min. after i.v. injection of various I^{131} labelled fractions (results expressed as tissue (g)/blood (g) and total thyroid/blood (g)).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.

TABEL VI

Hoeveelheid radioactiviteit in het bloed (1 ml) en in de nier (1 g), benevens de nier (g)/bloed (g) ratio van geadrenalectomeerde ratten en controledieren 5 en 20 minuten na de injectie van corticotrophine* (radioactiviteit uitgedrukt in c. p. m.).

Tijd in minuten:	groep	bloed 1) c.p.m./ml ± s.e.	nier 1) c.p.m./g ± s.e.	nier (g)/bloed (g) ± s.e.
5	geadrenalectomeerde ratten	2617 ± 151	18420 ± 2680	6,9 ± 1,36
	controles	3521 ± 597	16860 ± 2600	5,3 ± 1,35
20	geadrenalectomeerde ratten	1751 ± 304	21020 ± 3550	11,8 ± 0,93
	controles	1587 ± 461	19600 ± 4070	11,3 ± 0,75

Radioactivity in the blood (1 ml) and in the kidney, and the kidney (g)/blood (g) ratio from adrenalectomized rats and their controls 5 and 20 minutes after the injection of corticotrophin* (radioactivity as c. p. m.).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.

gekomen door de summatie van twee processen, namelijk de verdwijning van jodiden en de verdwijning van corticotrophine*.

Hieruit volgt, dat de verdwijningssnelheid en de orgaan/bloed ratio van het gemerkte corticotrophine groter zijn dan wij hier gevonden hebben.

De hoge activiteit in de schildklier na injectie van gemerkte eiwitten, zal veroorzaakt worden door het mede in de circulatie komen van deze vrije jodiden en door jodiden, die zullen ontstaan bij de afbraak van deze gemerkte eiwitten.

De in de schildklier aanwezige totaalactiviteit, uitgedrukt als percentage van de ingespoten dosis, is gering. Er gaan ongeveer gelijke hoeveelheden radioactiviteit afkomstig van zowel corticotrophine* als wel van andere gemerkte eiwitten naar de bijnier (tabel V).

Er bestaan geen gegevens omtrent een eventueel aangrijpen van corticotrophine buiten de bijnier. Bij hypophyseloze, bijnierloze ratten keert de volledige werkcapaciteit terug na toediening van bijnierschorsextracten + corticotrophine (Ingle 1953). Het argument van Ingle, dat er wel een ander aangrijpingspunt zou kunnen zijn, lijkt niet aanvaardbaar, gezien andere substitutie niet werd toegepast en slechts enkele corticotrophine preparaten het bovengenoemde effect bezaten.

Bij de in ons eigen experiment gebruikte proefdieren (ratten van gemiddeld 165 g) is het gewicht van de beide nieren bij benadering 1,2 g.

Van de ingespoten dosis corticotrophine* wordt 20 minuten na de injectie 10 tot 15 % in één gram nier gelocaliseerd, d.w.z. dat 12 tot 18 % in de totale nier terecht komt (tabel VII). Deze waarneming is in overeenstemming met de proeven van Sayers, die 5 en 15 minuten na de injectie van ratten corticotrophine bij ratten resp. 20 en 15 % van het toegediende corticotrophine in een biologisch werkzame vorm in de nier terugvond.

Uit de in hoofdstuk II beschreven gegevens kon niet worden afgeleid, of het gejodeerde corticotrophine zich op gelijke wijze gedraagt als het uitgangsproduct.

De overeenstemming die er bestaat tussen de hier genoemde experimenten van Sayers en onze eigen waarnemingen, is een aanwijzing, dat er geen verschil bestaat in het verdelingspatroon van gejodeerd en niet gejodeerd corticotrophine.

Er blijken behalve van corticotrophine, ook even grote percentages van de ingespoten doses van een corticotrophine* preparaat bereid volgens de methode van Astwood, van een hormonaal onwerkzaam hypophyse eiwit* en van een placenta eiwit*, naar de nier te gaan (tabel VII).

Het corticotrophine B-preparaat wordt minder sterk in de nier geconcentreerd.

Kassenaar c.s. (1955) kwamen tot gelijke conclusies voor het thyreotrope hormon. Twintig minuten na injectie van dit hypophyse hormon, gemerkt met radioactief jodium, werd ca 20 % van de ingespoten radioactiviteit in de nier teruggevonden.

De biologische activiteit van thyreotroop hormon in de nier, kon bepaald worden volgens de ijk-methode door Querido c.s. (1953) beschreven. Het bleek hierbij, dat evenals de radioacti-

TABEL VII

Hoeveelheid radioactiviteit in de nier 20 min. na de injectie van verschillende gemerkte eiwitten. De getallen zijn uitgedrukt als percentage van de ingespoten dosis/gram nier.

preparaat	%J*/g nier	preparaat	%J*/g nier
corticotrophine*	15	serum alb.*(bovine)	2
"	15	"	1.5
"	10	"	2
"	12	γ globuline*(humaan)	1
"	11	ovalbumine*	3
"	14	"	3
"	13	levereiwit*	0.5
C.O.C.*	11	spiereiwit*	0.5
B. prep.*	5		
Horm. onwerkz.*			
hypophyse fractie*	11		
placenta eiwit*	10		

Localization of radioactivity in the kidney 20 min. after the injection of several labelled proteins. The results are expressed as the fraction of the administered dose which localizes per gram of kidney.

viteit ook de biologische activiteit van het ingespoten thyreotroop hormon in de nier geconcentreerd wordt.

Na toediening van gemerkt prolactine vinden Sonenberg c.s. (1951b) het grootste percentage in de nier terug. De verdeling van insuline* in het organisme vertoont een gelijkvormig beeld als van de hier beschreven hypophysehormonen (Haugaard c.s. 1954, Elgee c.s. 1954).

Een aantal andere eiwitten blijkt in tegenstelling tot de hier opgesomde eiwitten in veel minder sterke mate in de nier geconcentreerd te worden (tabel VII). Hieruit blijkt dus dat de door ons geteste gemerkte eiwitten onderscheiden kunnen worden in twee groepen.

Van de eerste groep waartoe corticotrophine behoort, wordt ongeveer 15 % van de ingespoten hoeveelheid, 20 min. na injectie in de nier teruggevonden, terwijl van de tweede groep eiwitten slechts maximaal 3 % naar de nier toegaat.

Een verklaring voor het verschijnsel, dat in ca. 0,7 % van het lichaamsgewicht 15 % van het ingespoten product terug te vinden is, valt niet te geven.

Op grond van de waarnemingen van Sayers c.s. en Kassenaar c.s. is het niet waarschijnlijk, dat de radioactiviteit in de nier afkomstig is van afbraakproducten van het ingespoten eiwit. Deze beide groepen van onderzoekers vonden, dat corticotrophine en thyreotroop hormon in de nier worden geconcentreerd in een biologisch actieve vorm. Onze eigen waarnemingen pleiten tegen een afbraak van corticotrophine* door de bijnier of in het bloed (Pincus c.s. 1952). Tussen de hoeveelheid teruggevonden radioactiviteit in het bloed, de nier, en de nier/bloed ratio bij bijnierloze rat-

ten en hun controles (tabel VI), bestaat geen verschil. De bijnier heeft dus geen invloed op de hoeveelheid radioactiviteit die naar de nier toegaat. Het is dan ook niet waarschijnlijk, dat de radioactiviteit in de nier afkomstig is van door de bijnier afgebroken corticotrophine*. Het feit, dat de bijnier weinig invloed uitoefent op de omzetting van corticotrophine*, is in overeenstemming met de in de inleiding genoemde publicaties. Dat wij hier rekening moeten houden met de waarneming van Pincus, dat corticotrophine in het bloed geinactiveerd wordt, lijkt ons weinig waarschijnlijk.

Deze onderzoeker vond na incubatie gedurende een uur bij 37,5° C van zuur gehydrolyseerde hypophyse extracten in rattenbloed een verlies van de corticotrophine activiteit van deze extracten. Corticotrophine bereid volgens de methode van Astwood c.s. (1951) vertoont na incubatie in het bloed geen achteruitgang van de corticotrophine activiteit. De verdwijningssnelheid uit het bloed van zowel een COC preparaat (bereid volgens Astwood) en een onwerkzaam hypophyse preparaat, verschilt niet (figuur II). De veronderstelling, dat het hier een inactivatie van het ingespoten corticotrophine in de bloedbaan betreft, is door deze waarneming wel zeer onwaarschijnlijk.

Het is zeer wel mogelijk dat de ingespoten hypophyse eiwitten, het placenta eiwit en insuline onveranderd in de nier komen. De boven beschreven waarnemingen impliceren, dat de rattennier over een vooralsnog onbekend mechanisme beschikt om bepaalde eiwitten in zeer sterke mate te kunnen concentreren. Wij hebben getracht door middel van de hierna te beschrijven experimenten nadere gegevens te verzamelen omtrent de aard van dit mechanisme. De vraag welke karakteristieke eigenschappen deze eiwitten gemeen hebben, werd door ons niet in het onderzoek betrokken.

Conclusie

Het gedrag van gemerkt soortvreemd corticotrophine is gelijk aan het door Sayers toegediende soorteigen corticotrophine.

Het in deze studie bestudeerde metabolisme van corticotrophine* wordt identiek gesteld aan het metabolisme van toegediend niet-gemerkt corticotrophine.

Twintig minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine wordt de grootste concentratie in de nier teruggevonden, gelijk dit inmiddels ook gevonden is voor andere hypophysevoorkwab hormonen, als b.v. thyreotroop hormon (Kassenaar c.s.) en voor insuline.

Onze waarneming, dat ook een hormonaal inactieve hypophysefractie en placenta-eiwit zich op gelijke wijze gedragen, maakt het onwaarschijnlijk, dat de snelle verdwijning uit het bloed en de grote concentratie in de nier na intraveneuze toediening van deze hormonen, uitsluitend te wijten zou zijn aan de hormonale werking die zij bezitten.

De vraag, op grond van welke eigenschappen deze stoffen in de nier geconcentreerd worden, moet hier onbeantwoord blijven.

Hoofdstuk IV

INVLOED VAN DE NIER EN LEVER OP DE HOEVEELHEID TOEGEDIEND GEMERKT CORTICOTROPHINE

Inleiding

Uit de waarnemingen die in het vorige hoofdstuk beschreven werden, bleek, dat 20 minuten na de injectie van corticotrophine* door de nier en lever tesamen ongeveer 25% van de ingespoten dosis is opgenomen. Om een nader inzicht te verkrijgen in de aard van dit phenomeen werd door ons nagegaan: a) of de verdeling van de ingespoten radioactiviteit op verschillende tijden na de injectie in de nier en lever gelijk is, b) welke invloed de nier heeft op de concentratie van de radioactiviteit in het bloed na injectie van corticotrophine*.

Hiertoe werden de volgende experimenten uitgevoerd.

Methodiek

Aan 9 groepen van 5 ratten werd corticotrophine* toegediend. Na resp. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 en 20 minuten werden 5 proefdieren gedood en de radioactiviteit in het bloed, de nier en lever bepaald. Voor de gebruikte techniek en dosering zij verwezen naar hoofdstuk II en III.

Bij drie groepen van 5 ratten werden, voor de toediening van corticotrophine, de nieren gedecapsuleerd en aan de hilus onderbonden. Drie andere groepen van ratten dienden als controles; bij hen werd de nier wel gedecapsuleerd maar niet onderbonden.

Op verschillende tijden na de injectie werd bij de ratten met onderbonden nieren en bij de ratten waarbij een schijn-operatie was uitgevoerd, bloed uit de staart afgenomen. Hierin werd de radioactiviteit bepaald op gelijke wijze als in Hoofdstuk III is beschreven.

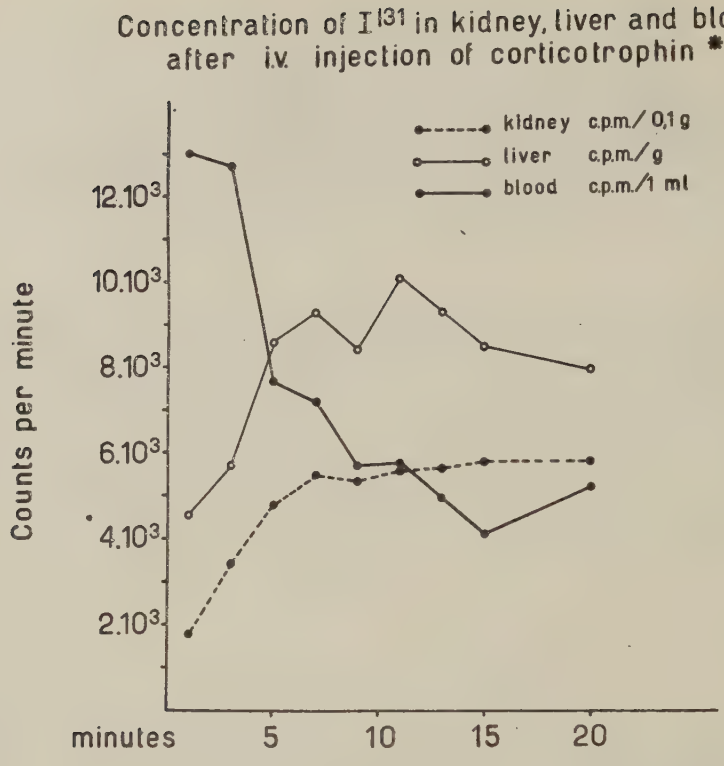
Resultaten

Het blijkt dat de radioactiviteit in de nier en lever 5 minuten na i.v. injectie van gemerkt corticotrophine niet significant meer toeneemt (fig. III, tabel VIII).

De sterkste daling van de radioactiviteit in het bloed heeft in de eerste vijf minuten na de injectie plaats (fig. III en IV, tabel VIII).

Fig. IV toont dat op de afnamesnelheid van de radioactiviteit in het bloed gedurende de eerste 5 minuten na de injectie, sterke invloed wordt uitgeoefend door de nier.

In tabel IX is de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed van de ratten met onderbonden nieren en van de controle dieren uitgedrukt als percentage van de na één minuut gevonden waarde. De



Figuur III
Concentratie van J^{131} in de nier, de lever en het bloed op verschillende tijden na de injectie van corticotrophine*.

concentraties van de radioactiviteit in het bloed van deze beide groepen ratten verschilt 5 minuten na de injectie 23 tot 28%. Dit verschil blijft de hierop volgende 15 minuten vrijwel constant.

Discussie

De tijd waarin de concentratie van de radioactiviteit in het bloed na toediening van soortvreemd corticotrophine* zijn halve waarde bereikt, ligt in onze experimenten tussen de 5 en 7 minuten. Deze waarneming is in overeenstemming met de experimenten van Greenspan.

Deze onderzoeker bepaalde bij ratten op verschillende tijden na i.v. injectie van 5 mg corticotrophine, langs biologische weg de activiteit in het bloed.

De verdwijningscurve van gemerkt corticotrophine uit het bloed is samengesteld uit verschillende componenten (fig. III en IV). De concentratïe van de radioactiviteit in het bloed wordt in de eerste tijd na de injectie sterk beinvloed door de aanwezigheid van de nieren. Het toegediende gemerkte eiwit wordt zeer waarschijnlijk onveranderd door de nier opgenomen (hoofdstuk III). Uit fig. III blijkt dat de radioactiviteit in de nier in de eerste minuten na de

TABEL VIII

Radioactiviteit per 1 ml bloed, per 1 g nier en per 1 g lever op verschillende tijden na een intraveneuze injectie van corticotrophine*. (Radioactiviteit uitgedrukt als c.p.m.).

Minuten na injectie	bloed [1] c.p.m./ml ± s.e.:	nier [1] c.p.m./g ± s.e.:	lever [1] c.p.m./g ± s.e.:
1	13032 ± 823	17500 ± 1240	4540 ± 378
3	12707 ± 716	34040 ± 2740	5710 ± 194
5	7652 ± 828	47780 ± 3230	8580 ± 424
7	7337 ± 589	54660 ± 1310	9270 ± 934
9	5685 ± 292	52760 ± 4150	8410 ± 340
11	5743 ± 328	55420 ± 2150	10520 ± 1090
13	4913 ± 402	55800 ± 2230	9220 ± 1000
15	4024 ± 616	57380 ± 2230	8380 ± 389
20	4654 ± 646	57680 ± 1030	7850 ± 912
1	16915 ±2340	3452 ± 214	
5	12921 ±1015	7065 ± 796	
9	9467 ± 376	9634 ± 395	
20	8120 ± 370	7069 ± 279	

Radioactivity in blood (1 ml), kidney (1 g) and liver (1 g) at different times after an intravenous injection of labelled corticotrophin. (Radioactivity expressed as counts per minute)

1) gemiddelde van 5 waarnemingen
mean of 5 observations.

injectie van corticotrophine* geleidelijk toeneemt. Hieruit mogen wij concluderen dat de daling van de radioactiviteit in het bloed de eerste periode na de injectie, niet uitsluitend veroorzaakt wordt door een omzetting van het ingespoten product. De afname van de corticotrophine concentratie in het bloed gedurende deze tijd is dus geen goede maat voor de snelheid waarmee het toegediende corticotrophine in het organisme wordt omgezet. Op grond hiervan mag de halveringstijd van toegediend corticotrophine niet berekend worden uit waarnemingen kort na de injectie hiervan gedaan (Gemzell, Greenspan, Richards). Dat de overlevingsduur van corticotrophine in het organisme waarschijnlijk zeer kort is, moge blijken uit de hier reeds eerder beschreven experimenten van Sydnor c.s. (1953b) waarin de halveringstijd van endogeen corticotrophine op ruim één minuut bepaald werd.

Onafhankelijk van het onderbinden van de nieren blijft de radioactiviteit de eerste 5 minuten na de injectie sterker dalen dan gedurende de daarop volgende 15 minuten (fig. IV en tabel IX). Uit

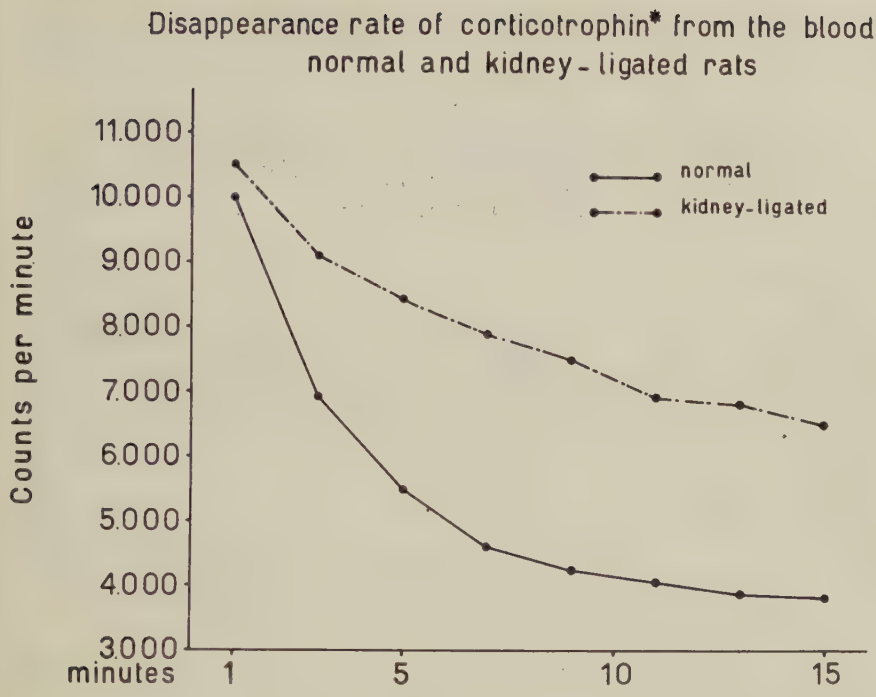
TABEL IX

Radioactiviteit in het bloed van ratten met onderbonden nieren en hun controles op verschillende tijden na een i.v. injectie van corticotrophine* (De hoeveelheid radioactiviteit is uitgedrukt als percentage van de na één minuut gevonden waarde).

Min. na de injectie:	Experiment I [1]:			Experiment II [1]:			Experiment III [1]:		
	onderbonden nieren %	controles %	Δ	onderbonden nieren %	controles %	Δ	onderbonden nieren %	controles %	Δ
1	100	100	0	100	100	0	100	100	0
3	87	82	5						
5	80	57	23	80	53	27	81	53	28
7	75	48	27						
9	71	44	27						
10				74	50	24	65	33	32
11	66	42	24						
13	65	40	25						
15	62	40	22	63	41	22	56	27	29
20				57	37	20	45	20	25

Radioactivity in the blood of kidney-ligated rats and their controls at different times after an i.v. injection of labelled corticotrophin (Radioactivity expressed as percentage of the one minute value).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.



Figuur IV
Verdwijningssnelheid van corticotrophine* uit het bloed van ratten met onderbonden nieren en van hun controles.

tabel VIII blijkt dat van de eerste tot de vijfde minuut de concentratie van de radioactiviteit per gram lever met 4040 c.p.m. stijgt. De levers van onze ratten wogen ca 6,5 g. Gedurende deze periode neemt de totaal activiteit in de lever dus met 26.260 c.p.m. toe. Op dezelfde manier berekend zal bij een totaal niergewicht van 1,2 g gedurende deze periode de concentratie in de nier met 12 x 3030 c.p.m. = 36.360 c.p.m. toenemen. De sterke daling van de radioactiviteit die de eerste 5 minuten na injectie van corticotrophine* in het bloed plaats vindt, wordt dus bijna in zijn geheel te weeg gebracht door de hoeveelheid radioactiviteit die naar de nier en lever toegaat.

Conclusie

De maximum concentratie in de nier en lever wordt ca 5 minuten na toediening van gemerkt corticotrophine bereikt. Een groot gedeelte van de hoeveelheid radioactiviteit die gedurende deze periode uit het bloed verdwijnt, gaat naar de nier en lever toe. De tijd, waarin de eerste minuten na de injectie van corticotrophine de concentratie in het bloed tot de helft is afgenomen, mag niet de halveringstijd van corticotrophine genoemd worden. Bij genephrectomeerde ratten resp. hun controles, is de bloedconcentratie 15 minuten na de injectie, vergeleken met de éénminutswaarde, ongeveer 40 % resp. 60 % gedaald.

Hoofdstuk V

CORRELATIE TUSSEN DE HOEVEELHEID RADIOACTIVITEIT IN HET BLOED EN IN DE NIER

Inleiding

Na intraveneuze toediening van ca 200 en 600 ml plasma per dag gedurende max. 7 dagen, neemt de eiwitconcentratie in de intravasculaire ruimte en de n-uitscheiding met de urine nauwelijks toe; het grootste gedeelte van het geinfundeerde eiwit blijkt dan ook buiten de vaten te treden (Holman c.s. 1934; Elman c.s. 1943).

Whipple en zijn medewerkers (Fink c.s. 1944; Miller c.s. 1949; Yuile c.s. 1951) zagen, dat met C^{14} en N^{15} gemerkte plasma-eiwitten na intraveneuze toediening, in twee phasen uit de circulatie verdwijnen. Terwijl gedurende de eerste tijd na de injectie de bloedconcentratie snel afneemt, wordt in de tweede phase een langzamer verlopende daling waargenomen.

Fine en Seligman (1943) deden gelijke waarnemingen bij honden waaraan zij met radioactief zwavel gemerkte eiwitten toedienden. Hetzelfde phenomeen doet zich voor na injectie van meer homogene eiwitten zoals homologe antilichamen (Heidelberger c.s. 1942). De onderzoekingen met J^{131} gemerkt albumine (Sterling 1951) en globuline (Myant 1952) bevestigden de hypothese van Whipple, dat de snelle daling veroorzaakt wordt door een uitwisselen van de ingespoten gemerkte eiwitten, met extravasculair aanwezige, niet gemerkte gelijke eiwitten. De tweede meer langzame phase moet worden toegeschreven aan een verandering van de ingespoten stof ten gevolge van metabolische processen.

Teneinde de hoeveelheid van een stof, die in het organisme aanwezig is en waarvan de bloedconcentratie bekend is, te kunnen berekenen, dienen wij geinformeerd te zijn omtrent de „space" [1] van deze stof.

Onder space wordt verstaan het fictieve volume, waarover de ingespoten stof na equilibratie in het organisme verdeeld is en waarin de concentratie gelijk is aan de concentratie die aanwezig zou zijn in het bloed, indien er geen omzetting van het ingespoten product zou hebben plaats gehad.

In een formule uitgedrukt:

$$\text{space (in l)} = \frac{\text{hoeveelheid ingespoten stof}}{\text{concentratie in bloed (in l)}}$$

De space kan ook aldus geformuleerd worden:

$$\text{space} = a_1c_1 + a_2c_2 + a_3c_3 \ldots\ldots a_nc_n ,$$

1) Wij gaven aan dit woord de voorkeur boven het weinig gebruikte: „verdelingsvolume".

waarin $a_1 \ldots\ldots a_n$, de anatomisch omschreven volumina van de verschillende organen zijn, waarin de te beschouwen stof S gelocaliseerd kan worden.

$$c_1 \ldots\ldots c_n = \frac{\text{hoeveelheid S/per gew. eenheid orgaan}}{\text{hoeveelheid S/per gew. eenheid bloed}} .$$

Het dient met nadruk te worden vastgesteld, dat bij het werken met het begrip space in genen dele gedacht wordt aan een anatomisch omschreven ruimte van deze grootte.

Zoals uit tabel V (hoofdstuk III) gebleken is, is de nier het enige orgaan dat na inspuiting van gemerkt corticotrophine dit eiwit in sterke mate concentreert; zodat in onze experimenten voor c_{nier} ca 10 werd gevonden.

De vraag rees of de c_{nier} onafhankelijk van de bloedconcentratie is, dan wel of deze grootheid daarmede varieert. Dit laatste zou o.a. het geval zijn indien bij het overschrijden van een bepaalde bloedspiegel voor corticotrophine het surplus naar de nier gaat; of als door de nier primair het corticotrophine uit de bloedbaan verwijderd wordt, totdat in dit orgaan een bepaalde concentratie bereikt is.

Om nadere gegevens hieromtrent te verkrijgen werden de volgende experimenten verricht.

Methode

Experiment I: Op gelijke wijze als beschreven bij de experimenten in hoofdstuk III, kregen twee groepen van vijf mannelijke ratten resp. 1 I.U. en 5 I.U. gemerkt corticotrophine i.v. toegediend. Het gemerkt corticotrophine werd bereid op de wijze als beschreven is in hoofdstuk II. Twintig minuten na de injectie werden de nier/bloed ratio's bepaald.

Experiment II: Aan drie groepen van vijf mannelijke ratten werd gemerkt corticotrophine i.v. toegediend. Groep I kreeg op t_0 5 I.U. gemerkt corticotrophine en twintig minuten na deze injectie (t_{20}) een tweede injectie van 5 I.U. Op verschillende tijden gerekend vanaf de eerste injectie, werd bloed uit de staart afgenomen en in een leucocyten pipet opgezogen, waarvan de radioactiviteit werd bepaald, gelijk dit in hoofdstuk III beschreven is. Veertig minuten na de injectie (t_{40}) werden de nier/bloed ratio's bepaald. Groep II kreeg op t_0 5 I.U. gemerkt corticotrophine en op t_{20} een placebo-injectie van 0,5 ml 0,9 % NaCl.

Op dezelfde tijden en op gelijke wijze als bij groep I, werd de activiteit in het bloed en de nier/bloed ratio bepaald. Bij groep III werd resp. 1, 5, 10, 15 en 20 minuten vóór de injectie van gemerkt corticotrophine een hoeveelheid bloed uit de staart afgenomen en op gelijke tijden ná de injectie. Van deze laatste porties werd de hoeveelheid radioactiviteit gemeten. Twintig minuten na de injectie werd de nier/bloed ratio bepaald.

Resultaten

De nier/bloed ratio na injectie van 1 resp. 5 I.U. gemerkt corticotrophine verschilt niet significant (tabel X).

TABEL X

Nier/bloed ratio's en de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed (g) en de nier (g) 20 minuten na de injectie van 1 I.U. en 5 I.U. corticotrophine* (radioactiviteit uitgedrukt als c.p.m.).

Ingespoten dosis c.p.m.	I.U.	bloed [1] c.p.m./g ± s.e.	nier [1] c.p.m./g ± s.e.	nier (g)/ bloed (g) ± s.e.
568.000	5	8120 ± 370	70690 ± 2790	8,6 ± 0,66
113.700	1	1500 ± 117	17630 ± 2460	11,8 ± 1,46

Kidney/blood ratio's and the radioactivity in the blood and kidneys 20 minutes after an injection of 1 I.U. and 5 I.U. labelled corticotrophin (radioactivity expressed as c.p.m.).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.

TABEL XI

De nier/bloed ratio's en de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed/g en in de nier/g 20 en 40 minuten na een eerste en 20 minuten na een tweede injectie van corticotrophine* (radioactiviteit uitgedrukt in c.p.m.).

Tijd:	Bloed [1] c.p.m./g ± s.e.:	Nier [1] c.p.m./g ± s.e.:	Nier/bloed ± s.e.:
20 min. na 1e inj.	9360 ± 460	9375 ± 470	10,1 ± 0,55
	$	$p < 0,01$	$p < 0,01$
40 min. na 1e inj.	7040 ± 710	5070 ± 290	7,3 ± 0,7
20 min. na 2e inj.	12470 ± 930	15780 ± 1250	13 ± 1,6

The kidney/blood ratio's and the radioactivity in the blood (g) and kidney (g) 20 and 40 minutes after a first injection and 20 minutes after a second injection of labelled corticotrophin (radioactivity expressed as c.p.m.).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen
Mean of 5 observations.

Uit tabel XI blijkt dat er geen verschil is tussen de nier/bloed ratio's twintig minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine, vergeleken met de nier/bloed ratio's twintig minuten na een tweede injectie van gemerkt corticotrophine. Er is een significant verschil tussen deze laatste groep van ratten en die waarbij de nier/bloed ratio veertig minuten na de injectie bepaald werd.

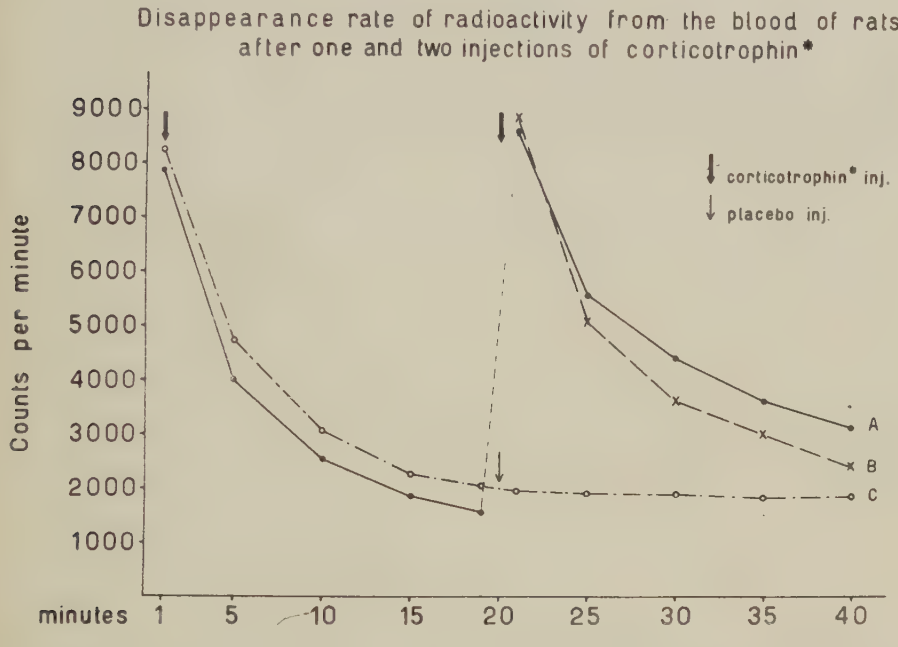
In een aanvullend experiment waarbij het tijdsverschil twee

maal zo groot werd gekozen, bleken de nier/bloed ratio's nog sterker uiteen te lopen.

Resp. 20 en 60 minuten na de injectie werden de volgende waarden gevonden:

20 min. na de injectie 9,7 $\pm$ 0,03
60 min. na de injectie 3,8 $\pm$ 0,03
$p < 0,001$.

Bij de groep die met een tussenperiode van twintig minuten twee i. v. injecties van gemerkt corticotrophine kreeg, wordt geen verschil in de snelheid van afname van de radioactiviteit in het bloed na elk van de beide injecties, gezien (fig. V, curve A).



Figuur V
Verdwijningssnelheid van de radioactiviteit uit het bloed van ratten na één en twee injecties van corticotrophine*.

De radioactiviteit uit het bloed van de beide andere groepen verdwijnt de eerste twintig minuten na de injectie met dezelfde snelheid (fig. V, curve B en C). De hoeveelheid radioactiviteit in het bloed verschilt 15 en 40 minuten na de injectie van corticotrophine* niet (curve C).

Discussie

De nier/bloed ratio's van de beide groepen ratten die resp. met 1 en 5 I. U. corticotrophine* werden ingespoten verschillen niet significant. Hieruit mag geconcludeerd worden dat onafhankelijk van de gebruikte doses corticotrophine het concentratievermogen van de nier constant blijft.

Het feit, dat de nier/bloed ratio's 40 en 60 min. na de injectie van corticotrophine verschillen met de gevonden waarde twintig minuten na de injectie, impliceert dat de radioactiviteit in het bloed en de nier gelijkelijk afneemt.

De vraag rijst of op deze tijd het vermogen van de nier om het ingespoten eiwit te concentreren afgenomen is of dat er een omzetting van de ingespoten stof heeft plaats gehad.

Het vermogen van de nier om corticotrophine te concentreren, blijkt althans 40 minuten na de eerste injectie ongewijzigd te zijn. Het blijkt nl. dat van een tweede hoeveelheid van 5 I.U. corticotrophine toegediend twintig minuten na de eerste injectie ongeveer gelijke delen in de nier geconcentreerd worden als van de 1e injectie.

Er bestaat geen reden om aan te nemen dat het nier-mechanisme op verschillende tijden na de injectie anders werkt. Uit het feit dat de activiteit in de nier 40 minuten na de injectie van corticotrophine wel duidelijk verminderd is, bij een gelijk gebleven concentratievermogen, terwijl de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed practisch ongewijzigd is gebleven, mag geconcludeerd worden, dat er een omzetting van het ingespoten gemerkte corticotrophine heeft plaats gevonden.

Meer directe experimentele gegevens hiervoor worden in het volgende hoofdstuk gegeven.

Hoofdstuk VI

OMZETTING, SPACE EN HALVERINGSTIJD VAN GEMERKT CORTICOTROPHINE

Inleiding

In hoofdstuk V werd gezien dat bij een gelijk gebleven vermogen van de nier om corticotrophine te concentreren, na verloop van tijd de nier J^{131}/bloed J^{131} ratio afnam.

Dit wekte het vermoeden op, dat de radioactiviteit in het bloed enige tijd na de injectie niet meer uitsluitend aan dezelfde hoeveelheid circulerend gemerkt corticotrophine toegeschreven mocht worden. Derhalve hebben wij getracht een nauwkeuriger maat te verkrijgen voor de hoeveelheid circulerend corticotrophine.

Het merken van eiwitten met J^{131} heeft het voordeel, dat indien bij de afbraak van dit gemerkte eiwit J^{131} vrijkomt, dit behalve in de schildklier, elders in het organisme niet meer in eiwitten ingebouwd wordt.

De hoeveelheid aan eiwit gebonden J^{131} in het plasma, verminderd met de hoeveelheid door de schildklier uitgescheiden eiwit gebonden J^{131}, is dus gelijk aan de hoeveelheid toegediend eiwit gebonden J^{131} die zich op dat moment nog in de circulatie bevindt. Om de verdwijningssnelheid uit het bloed van soortvreemd corticotrophine na te gaan, werd op verschillende tijden na de injectie van gemerkt corticotrophine, de hoeveelheid aan eiwit gebonden J^{131} in het plasma gemeten.

Als maat voor de hoeveelheid circulerend eiwit gebonden J^{131} werd de hoeveelheid radioactiviteit in de trichloorazijnzuur praecipitabele plasma fractie bepaald.

Wij willen hier nadrukkelijk vaststellen, dat na injectie van corticotrophine* de hoeveelheid radioactiviteit in de trichloorazijnzuur praecipitabele plasma fractie niet parallel behoeft te lopen met de hoeveelheid biologisch actief corticotrophine. De hoeveelheid radioactiviteit in de genoemde fractie is slechts een maat voor de hoeveelheid toegediend gemerkt eiwit, die nog in de circulatie aanwezig is.

Methode

In drie afzonderlijke experimenten werd op verschillende tijden na de injectie van corticotrophine* de radioactiviteit bepaald in de nier, de lever, het bloed, de trichloorazijnzuur praecipitabele plasma fractie (t.c.a.) en in de bovenstaande vloeistof hiervan.

In deze experimenten werden dezelfde methoden gebruikt als in de vorige hoofdstukken beschreven zijn. In de tabellen zijn de gevonden waarden opgegeven als gemiddelde van vijf waarnemingen.

Om de t.c.a. praecipitabele fractie van de rest van het plasma te scheiden, werd aan 1 ml plasma 1 ml van een 25 % oplossing

van t.c.a. toegevoegd en hierna gedurende 10 minuten gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd afgeschonken en het praecipitaat werd gewassen met 1 ml t.c.a. (25 %). Het aldus verkregen t.c.a. praecipitaat werd opgelost in 1 ml 40 % KOH. De bovenstaande vloeistof en het praecipitaat werden met aqua dest. tot 10 ml aangevuld en de radioactiviteit hierin bepaald. In het vervolg wordt steeds onder bovenstaande vloeistof verstaan de bovenstaande vloeistof van het t.c.a. praecipitaat van 1 ml plasma.

Om een indruk te krijgen van de hoeveelheid door de schildklier uitgescheiden eiwit gebonden J^{131}, werden 5 ratten ingespoten met 0,5 ml NaJ^{131} (4 μC). 10 ml van deze oplossing bevatte 40 μg jodium. Zestig minuten na de injectie werd de radioactiviteit gemeten in de nier, in het bloed en in de t.c.a. praecipitabele fractie van het plasma.

Resultaten

De radioactiviteit in het bloed na toediening van gemerkt corticotrophine verschilt 10, 20 en 60 minuten na de injectie niet (fig. VI).

Zoals uit tabel XII blijkt nemen de nier/bloed en lever/bloed ratio's 10 minuten na de injectie af. Dit is een bevestiging van onze vroegere waarnemingen (zie inleiding). De hoeveelheid radioactiviteit in de bovenstaande vloeistof neemt 10 minuten na de injectie van corticotrophine toe. Het verschil tussen de na 10 en 60 minuten gevonden waarde is significant ($p < 0,01$).

De hoeveelheid radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele plasma fractie daalt gedurende dezelfde periode. Eén uur na de injectie is de hoeveelheid radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele plasma fractie ongeveer de helft van de na 10 en 20 minuten gevonden waarden (tabel XIII). De hoeveelheid radioactiviteit in deze fractie verschilt 10 en 20 minuten na de injectie niet. De nier- en lever/t.c.a. praecipitabele plasma ratio's 60 minuten na de injectie, verschillen in het eerste experiment niet met de na 10 en 20 minuten gevonden ratio's; in het tweede experiment is er geen significant verschil tussen de berekende ratio's na 20, 40 en 60 minuten.

Bij de dieren die met NaJ^{131} waren ingespoten, werden één uur na de injectie in 1 ml bloed ruim 1 % van de ingespoten dosis teruggevonden, terwijl maximaal 0,04 % in de t.c.a. praecipitabele fractie van 1 ml plasma bleek voor te komen. Op dat moment bedroeg de nier/bloed ratio 0,49 $\pm$ 0,018.

Discussie

Gemerkt corticotrophine, door ons gedurende enkele weken bij 4° C bewaard, splitste geen vrije Jodiden af. De hoeveelheid J^{131} gebonden aan corticotrophine verminderde niet nadat het gemerkte corticotrophine gedurende drie dagen bij kamertemperatuur in rattenplasma geincubeerd was.

Eisen en Keston gingen de stabiliteit na van onder ongeveer ge-

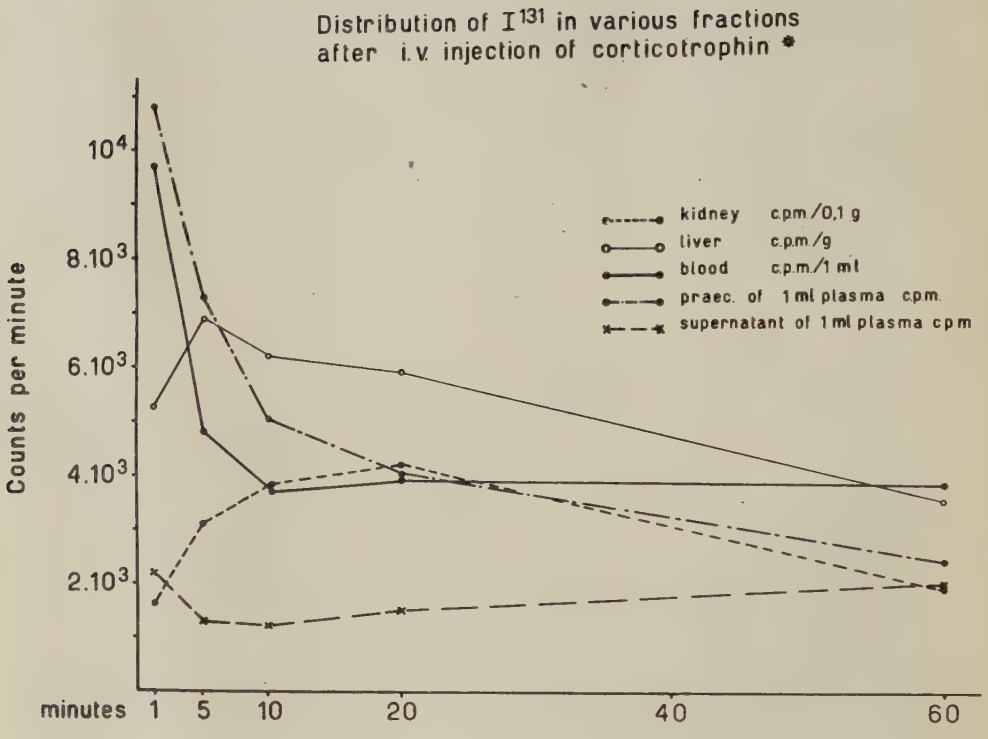
TABEL XII

Orgaan/bloed en orgaan/trichloorazijnzuur praecipitabele plasma ratio's gemeten op verschillende tijden na intraveneuze injectie van corticotrophine*.

Minuten na injectie:	nier/bloed 1) ± s.e.:	nier/plasma praec. 1) ± s.e.:	lever/bloed 1) ± s.e.:	lever/plasma praec. 1) ± s.e.:
1	1,9 ± 0,16	1,5 ± 0,05	0,6 ± 0,03	0,5 ± 0,03
5	6,8 ± 0,77	4,4 ± 0,5	1,6 ± 0,42	1 ± 0,1
10	10,5 ± 0,6	8,3 ± 1,04	1,9 ± 0,28	1,5 ± 0,3
20	10,7 ± 0,46	9,4 ± 0,48	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,14
60	5 ± 0,26	7,8 ± 0,62	1 ± 0,04	1,5 ± 0,1
10	11,5 ± 1,06	12,8 ± 0,76	1,8 ± 0,15	1,9 ± 0,13
20	9,4 ± 1	8 ± 0,56	1,4 ± 0,07	1,8 ± 0,14
40	6,8 ± 0,58	10,4 ± 0,57	1,4 ± 0,19	2,2 ± 0,29
60	4,5 ± 0,32	8 ± 0,96	1,2 ± 0,06	2,4 ± 0,27

Organ/blood and organ/trichloro acetic acid precipitable plasma fraction ratios at different times after an intravenous injection of labelled corticotrophin.

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations



Figuur VI
Radioactiviteit in verschillende weefsels van de rat op verschillende tijden na een i.v. injectie van corticotrophine*.

lijke condities met J^{131} gemerkt albumine. Er traden geen veranderingen op in het gemerkt albumine nadat dit een maand bij 4^{o} C bewaard was.

Er bestaan dus geen redenen om aan te nemen, dat gemerkt corticotrophine in vitro J^{131} afsplitst. Het J^{131}, dat het eerste uur na de injectie van radioactieve jodiden door de schildklier als eiwit gebonden J^{131} wordt uitgescheiden, is te verwaarlozen t.o.v. de totale, in het plasma voorkomende hoeveelheid aan eiwit gebonden J^{131}. Deze laatste is dus een goede maat voor de plasma concentratie van de hoeveelheid toegediend gemerkt eiwit.

Eén uur na de injectie van gemerkt corticotrophine blijkt de radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele plasma fractie te zijn gedaald, terwijl de radioactiviteit in de bovenstaande vloeistof is toegenomen.

De verschuiving van de hoeveelheid radioactiviteit in de t.c.a.

TABEL XIII

Radioactiviteit in de trichloorazijnzuur praecipitabele plasma fractie op verschillende tijden na een intraveneuze injectie van corticotrophine* (Radioactiviteit uitgedrukt als c.p.m..).

Minuten na injectie:	Experiment I [1]: t. c. a. praec. plasma c.p.m. ± s.e.:	Experiment II [1]: t. c. a. praec. plasma c.p.m. ± s.e.	Experiment III [1]: t. c. a. praec. plasma c.p.m. ± s.e.:
10	5052 ± 300	4188 ± 161	2934 ± 324
20	4072 ± 275	5058 ± 463	
40		3381 ± 409	1763 ± 69
60	2396 ± 239	2686 ± 269	1466 ± 244

Radioactivity in the trichloro acetic acid precipitable plasma fraction at different times after an intravenous injection of labelled corticotrophin. (Radioactivity expressed as counts per minute).

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.

praecipitabele fractie van het plasma naar de bovenstaande vloeistof, moet toegeschreven worden aan een omzetting van het i.v. ingespoten gemerkte corticotrophine.

De mogelijkheid dat een met J^{131} gemerkt eiwit in vivo zijn merk verliest, zonder dat verandering in het eiwitmolecuul heeft plaats gevonden, menen wij op grond van de volgende literatuurgegevens te mogen verwerpen.

Na injectie van met J^{131} gemerkt insuline vinden Haugaard c.s. (1954) dat de eerste uren na de injectie geen jodiden van de gemerkte insuline moleculen worden afgesplitst.

Elgee c.s. (1954) zien na toediening van gemerkt insuline geen toename van de radioactiviteit in de bovenstaande vloeistof van een t.c.a. praecipitaat van het bloed. Met J^{131} gemerkt gamma globuline (Myant 1952) en albumine (Sterling 1951) i.v. bij mensen ingespoten, zijn twee weken na de injectie nog in het bloed aanwezig.

De snelle daling van de radioactiviteit in het bloed de eerste minuten na toediening van gemerkt corticotrophine, wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door een verdelen van het ingespoten corticotrophine over de verschillende lichaamscompartimenten. Deze daling komt bijna in zijn geheel neer op een snel afnemen van de hoeveelheid radioactiviteit, die in de t.c.a. praecipitabele plasma fractie aanwezig is (fig. VI). Daarna neemt de hoeveelheid radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele fractie van het plasma minder snel af. De radioactiviteit in de nier en de lever daalt met dezelfde snelheid als in de t.c.a. praecipitabele plasma fractie. De vermindering van de radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele fractie van het plasma zal, nadat de evenwichtsverdeling van het toegediende corticotrophine* bereikt is, een maat zijn voor de snelheid waarmee het toegediende corticotrophine wordt omgezet (inleiding hoofdstuk V). De hoeveelheid radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele fractie 60 minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine is ongeveer de helft van de gevonden waarde 10 en 20 minuten na de injectie (tabel XIII). Dit zou dus betekenen dat de halveringstijd van soortvreemd corticotrophine ongeveer 40 tot 50 minuten bedraagt. Deze waarde wijkt sterk af van de door Sydnor bij hypophyseloze en bijnierloze ratten aangegeven halveringstijd van endogeen corticotrophine van ruim één minuut. Voor deze discrepantie kunnen wij geen verklaring geven.

Om een indruk te krijgen omtrent de grootte van de corticotrophinespace, werd de regressielijn, getrokken door de punten die de hoeveelheid radioactiviteit aangeven in de t.c.a. praecipitabele plasma fractie 10, 20, 40 en 60 minuten na de injectie, tot $t = 0$ geextrapoleerd. Bij deze berekening gingen wij van de volgende veronderstellingen uit:

1e. de corticotrophine* space is gelijk aan de organisch gebonden J^{131} space.
2e. het organisch gebonden J^{131} in het bloed is uitsluitend in het plasma aanwezig.
3e. het kan hieruit volledig met t.c.a. neergeslagen worden.

De berekende hoeveelheid die op t_0 in de t.c.a. praecipitabele fractie van 1 ml plasma gevonden wordt, bedraagt 1,3 % van de ingespoten dosis. Bij een haematocrietwaarde van 60 % zal dus 1 ml bloed 0,7 % organisch gebonden J^{131} bevatten. De grootte van

de corticotrophinespace is dus 144 ml. Het gewicht van de gebruikte ratten was ongeveer 170 g. Hieruit volgt dat de corticotrophinespace ongeveer 85 % van het lichaamsvolume is.

Volgens Greenspan is dit de maximale grootte van de corticotrophinespace. Deze onderzoeker betrok ook het eerst stijle gedeelte van de curve in zijn berekening. Indien wij bij het bepalen van de regressielijn ook dit eerste gedeelte van de curve in onze berekening opnemen, wordt op t_0 een concentratie gevonden van 1 % organisch gebonden J^{131}/ml bloed. Dat wil zeggen dat volgens deze berekening de corticotrophinespace 60 % van het lichaamsvolume is. De hoogst berekende waarden worden gevonden indien het eerste gedeelte van de verdwijningscurve van corticotrophine dat toegeschreven moet worden aan het opvullen van de corticotrophinespace, buiten beschouwing wordt gelaten. Met absolute zekerheid kunnen wij de grootte van de corticotrophinespace hier niet opgeven. Ten eerste omdat de hoeveelheid t.c.a. praecipitabele J^{131} die na toediening van gemerkt corticotrophine in het plasma bepaald wordt, niets zegt omtrent de hoeveelheid circulerend hormonaal werkzaam corticotrophine. Ten tweede omdat in de eerste periode na de injectie de maximale concentratie in de lever en de nier nog niet is bereikt. Deze organen zullen ongetwijfeld een belangrijk aandeel in het metabolisme hebben. Indien er van hetgeen deze organen aangeboden krijgen een bepaald percentage omgezet wordt, zal de regressielijn tot het nulpunt naderend, meer horizontaal gaan lopen.

Conclusie

De t.c.a. praecipitabele plasma fractie blijkt een betere maat te zijn voor de hoeveelheid toegediend gemerkt corticotrophine dan de totaal J^{131} activiteit in het bloed. Uit het feit, dat de hoeveelheid radioactiviteit in de t.c.a. praecipitabele fractie 10 minuten na de injectie gedurig afneemt i.t.t. de hoeveelheid radioactiviteit in de bovenstaande vloeistof, mag afgeleid worden, dat er in het organisme een omzetting van het ingespoten corticotrophine* plaats heeft. Indien aangenomen wordt, dat de toegediende corticotrophine zich 10 à 20 minuten na de injectie gelijkelijk over de corticotrophine space verdeeld heeft, is de halveringstijd voor „corticotrophine" 40 à 50 minuten en de grootte van de „corticotrophinespace" ongeveer 85 % van het lichaamsvolume.

Hoofdstuk VII

UITSCHEIDING VAN GEMERKT CORTICOTROPHINE MET DE URINE

Inleiding

Lange tijd heeft er twijfel bestaan over de vraag of onder physiologische omstandigheden de urine al of niet eiwit zou bevatten. Met behulp van de ultrafiltratie en electrophorese techniek konden Rigas en Heller (1951) hoeveelheden eiwit in de urine aantonen, die varieerden van 30 tot 50 mg per 24 uur/urine. Tot dusverre staat vast, dat hormonaal werkzame stoffen met een eiwitachtige structuur in de urine kunnen voorkomen. De gonaden stimulerende hormonen vormen hier een voorbeeld van. Richards en Sayers (1951) konden bij ratten langs biologische weg geen corticotrophine in de urine aantonen. Na een intraveneus infuus van 240 mg (= 100 mg La-1-A Armour standaard) en 330 mg (= 50 mg La-1-A) corticotrophine in resp. $\frac{1}{2}$ en 1 uur bij de mens, kon geen corticotrophine in de urine aangetoond worden (Sayers c.s. 1949a). Deze onderzoekers konden in de door hen uitgevoerde biologische test minimaal 10 µg % corticotrophine aantonen.

Rubin c.s. (1954) bepaalden met behulp van een gemodificeerde ascorbinezuur depletie test, dat de urine van drachtige merriès per liter 2,5 - 3 I.U. corticotrophine bevat. In een aantal door hen onderzochte monsters urine van gezonde personen konden zij enige corticotrophine-activiteit aantonen. De gevonden hoeveelheid corticotrophine vertoonde een grote intra- en interindividuele spreiding. Na een chirurgische ingreep of toediening van corticotrophine werd er geen toename in de corticotrophine uitscheiding gezien.

Uit de bovenstaande literatuurgegevens valt niet met zekerheid te concluderen of corticotrophine met de urine uitgescheiden wordt. Deze onzekerheid was, naast de vaststaande feiten die over de uitscheiding van plasma eiwitten en gonadotrophine stoffen bestaan, voor ons een aanleiding om op verschillende tijden na de injectie van gemerkt corticotrophine, de radioactiviteit in de urine te bepalen en te trachten met behulp van de papierchromatographie de uitgescheiden J^{131} bevattende stoffen nader te analyseren.

Methodiek

Vier groepen van 5 mannelijke ratten werden i.v. ingespoten met gemerkt corticotrophine. Voor gegevens over materiaal en techniek zij verwezen naar hoofdstuk II en III. Vóór de injectie werd de blaas van de ratten zo goed mogelijk geledigd, door de dieren aan aether te laten ruiken.

Na de injectie werd de urethra van de ratten onderbonden; 7,

20, 60 en 120 minuten later werden de dieren gedood. Gedurende deze perioden werden de dieren onder narcose gehouden. Vervolgens werden de blaas + inhoud, schildklier en nier vrijgeprepareerd en werd de radioactiviteit hierin gemeten, zoals in hoofdstuk III beschreven is. De gevonden activiteit werd per totale schildklier, totale blaas + inhoud en per 100 mg nier uitgezet als gemiddelde van 5 waarnemingen.

Papierchromatogrammen werden gemaakt van urine van ratten die met gemerkt corticotrophine waren ingespoten. Daarnaast diende tevens als controle rattenurine waaraan gemerkt corticotrophine en J^{131} waren toegevoegd.

Op stroken papier (Whatman no. 1) van 18 x 60 cm werden op 10 cm van de bovenrand op een zo klein mogelijk oppervlak spots van 0,01 ml urine aangebracht.

In twee verschillende systemen werden ééndimensionale afdalende papierchromatogrammen gemaakt.

In navolging van Geschwind (1950) gebruikten wij als eerste systeem voor het chromatographeren van corticotrophine een phenol-water systeem.

Het phenol-water mengsel (phenol 100; aqua dest. 39) werd steeds vlak voor het gebruik bereid. De looptijd bedroeg ongeveer 20 uur bij kamertemperatuur (+ 21° C). Daarna werd het papier ongeveer een uur gedroogd bij 85° C; vervolgens gesprayed met 0,1 % ninhydrine in butanol en weer 3 tot 5 minuten gedroogd bij 105° C. Door het chromatogram in stukjes te knippen van maximaal 1,5 x 1,5 cm en deze onder een end-window β-teller te plaatsen, kon de radioactiviteit gemeten worden.

De phenol werd voor het gebruik gedestilleerd onder toevoeging van 12 % H_2O; 0,1 % aluminium krullen en 0,05 % $NaHCO_3$. De fractie die tussen 176 en 178° C overkomt, werd gebruikt.

Het tweede systeem waarvan wij gebruik maakten, bestond uit: n Butanol 4; Dioxaan 1; 2 n NH_4OH 5.

De verdere techniek, als looptijd, tijd van drogen, kleurmethode en bepalen van de radioactiviteit, was gelijk aan de hierboven bij het eerste systeem beschreven werkwijze.

Omtrent een aantal J^{131}-dragende producten die op de chromatogrammen aanwezig bleken te zijn, werd op de volgende wijze getracht nadere gegevens te verkrijgen.

De radioactieve spot die een zelfde R_f geeft als NaJ, werd met aqua dest. geëlueerd. Aan dit eluaat werd een hoeveelheid NaJ toegevoegd. Door oxydatie met KJO_3 - H_2SO_4 werden de aanwezige jodiden in vrij jodium omgezet.

Deze oplossing werd enkele malen met chloroform uitgeschud. Door de chloroform oplossing weer met natriumthiosulfaat uit te schudden, vormt zich weer NaJ.

De aard van de radioactieve spot die eenzelfde R_f had als thyroxine, werd met behulp van de isotoop verdunningstechniek nagegaan. Hierbij werd te werk gegaan volgens de techniek door Gross en Leblond (1950) beschreven.

De spot die dezelfde R_f had als corticotrophine werd op gelijksoortige wijze behandeld. Het hier gebruikte corticotrophine wordt in een alcalisch milieu gepraecipiteerd en kan daaruit weer met zuur worden opgelost. Door herhaalde malen het eluaat plus

het toegevoegde corticotrophine op deze wijze te behandelen, werd aldus getracht een isotoopdilutie te verkrijgen.

Zoals duidelijk is, worden hierbij alle J^{131}bevattende producten, die met corticotrophine gemeen hebben om in een alcalisch milieu neer te slaan en in een zuur milieu weer op te lossen, mee gemeten.

Om meer quantitatieve gegevens te verkrijgen over de uitscheiding van organisch gebonden- en anorganische jodiden, werd het volgende experiment uitgevoerd. Drie groepen van 5 ratten werden met gemerkt corticotrophine ingespoten en resp. 10, 40 en 60 minuten na de injectie verbloed. Een vierde groep van 5 ratten werd met NaJ^{131} ingespoten en 60 minuten na de injectie gedood. De urine van de 5 ratten uit een groep werd verzameld en met aqua dest. tot 5 ml aangevuld. Van deze verdunde urine werd 1 ml gebruikt om hierin met behulp van de bovenbeschreven methode gemerkte jodiden aan te tonen. De hoeveelheid radioactiviteit die in de urinerest en chloroform achterbleven, werden eveneens bepaald. Onder urinerest wordt het waterige residu verstaan, dat achterblijft als de urine met KJO_3-H_2SO_4 en chloroform behandeld is.

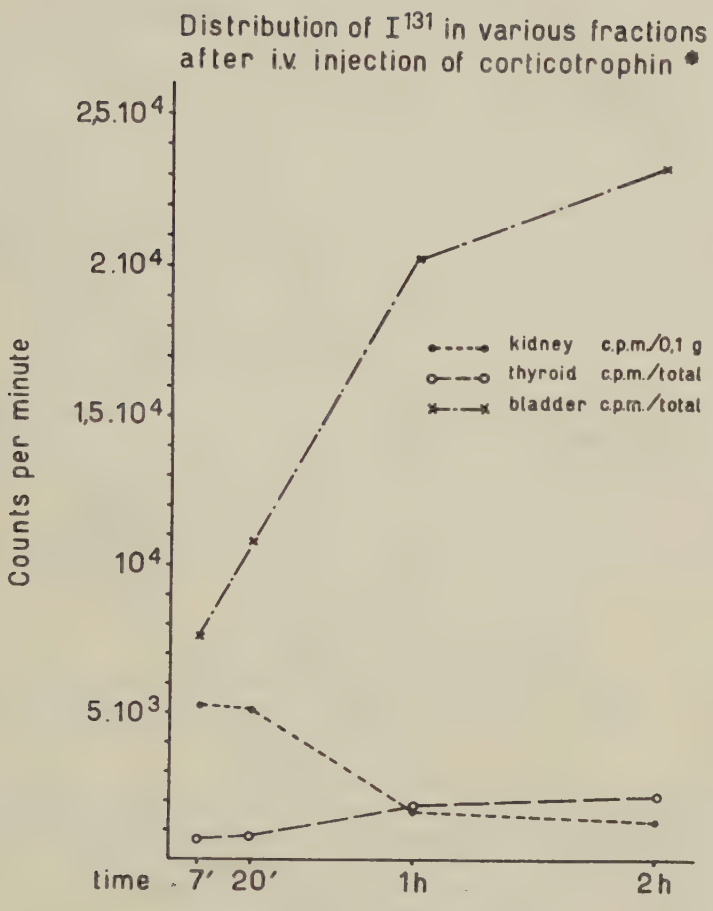
Als maat voor de hoeveelheid organisch gebonden jodium werd de radioactiviteit in het trichloorazijnzuur praecipitaat van 1 ml verdunde urine gemeten. De praecipitatie geschiedde op de wijze als in hoofdstuk VI voor plasma beschreven is.

Verder werd nagegaan in hoeverre in deze verdunde urine radioactieve producten voorkomen die evenals corticotrophine de eigenschap hebben om in een alkalisch milieu neer te slaan en in een zuur milieu op te lossen. Dezelfde procedure werd uitgevoerd met een monster van de gemerkte corticotrophine, die voor de injectie gebruikt werd. De gevonden radioactiviteit in de onderscheiden fracties en de hoeveelheid die in de blaas achter bleef, werd uitgedrukt als percentage van de totale hoeveelheid radioactiviteit, die de verzamelde urine bevatte.

Resultaten

In overeenstemming met de in hoofdstuk IV beschreven waarnemingen werd geen verschil gevonden tussen de radioactiviteit in de nier 7 en 20 minuten na de injectie (fig. VII). Het verschil in de hoeveelheid radioactiviteit welke in de blaas 7 en 20 minuten na de injectie gevonden wordt, is niet significant. Eén uur na de injectie is de radioactiviteit in de nier significant gedaald ($p < 0,001$) en in de blaas significant gestegen ($p < 0,001$) vergeleken met de waarnemingen na 7 en 20 minuten. De activiteit in de blaas twee uur na de injectie verschilt niet met de na één uur gevonden waarde. Twee uur na de injectie daalt de activiteit in de nier niet meer, vergeleken met de activiteit na één uur. De in de schildklier gevonden activiteit neemt geleidelijk toe.

Bij chromatographie van een urine waaraan corticotrophine was toegevoegd, in een systeem van phenol-water, blijkt dat de aanwezige radioactiviteit over twee toppen verspreid wordt (R_f van 0,10-0,20 en 0,96). NaJ in ditzelfde systeem gechromatographeerd, heeft een R_f van 0,10-0,18. Bij chromatographie in een



Figuur VII

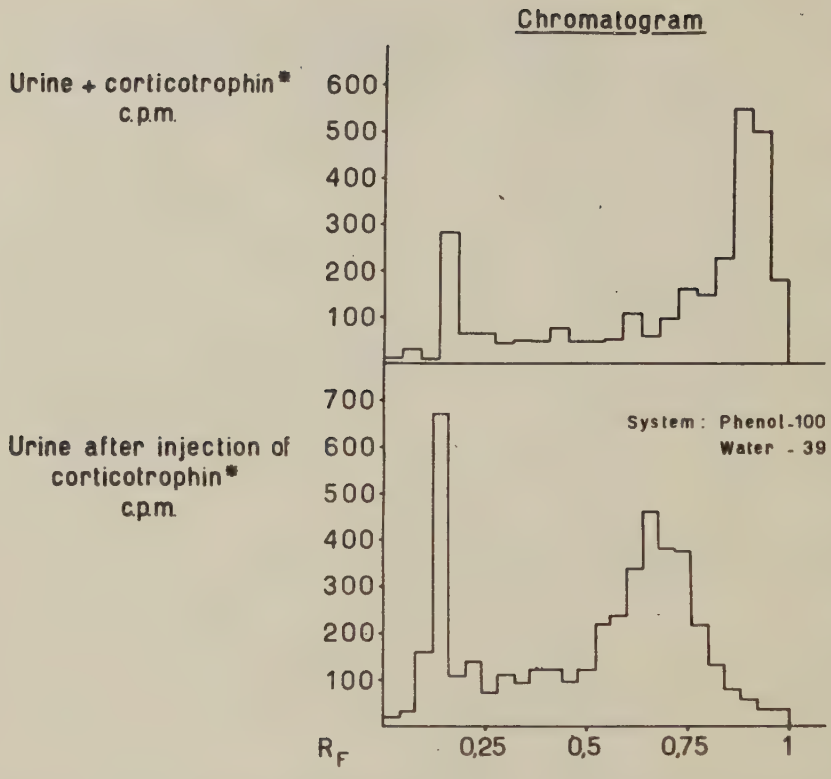
Radioactiviteit in de nier, schildklier en blaas op verschillende tijden na een i. v. injectie van corticotrophine.

phenol-watermengsel geeft Laws (1951) voor anorganische jodiden een R_f op van 0, 10. De eerste top blijkt dus een R_f te hebben die overeenkomt met de R_f van NaJ.

De tweede top loopt practisch met het front mee (R_f 0, 96). Deze top had na het drogen van het papier een bruinachtige kleur en fluoresceerde met een groene kleur in ultraviolet licht.

Geschwind (1950) vond bij chromatographie van corticotrophine in een zelfde systeem eveneens bruinachtige, groen fluorescerende vlekken met een R_f van 0,95. Dit fluorescerende gebied vertoonde na elutie corticotrophine activiteit, terwijl op de rest van het papier slechts minimale hoeveelheden corticotrophine gevonden werden. Bij de chromatographie van de urine van ratten die met gemerkt corticotrophine ingespoten waren, konden twee toppen, zij het in andere verhouding tot elkaar, onderscheiden worden, waarin de radioactiviteit gelocaliseerd werd.

De eerste top heeft eenzelfde R_f als NaJ.



Figuur VIII

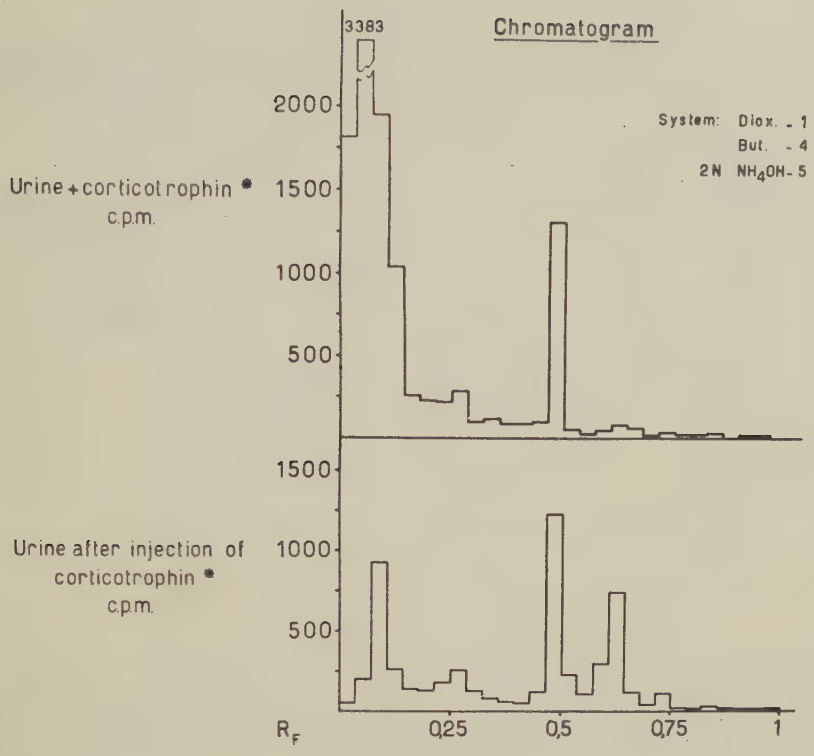
Verdeling van de radioactiviteit in een chromatogram, gemaakt van urine waaraan corticotrophine* was toegevoegd en urine van een rat die ingespoten was met corticotrophine*.
Gebruikte chromatographie systeem phenol-water.

De tweede top had een R_f van 0,65-0,77; deze top was bruinachtig gekleurd en gaf een groene fluorescentie in ultraviolet licht.

Na chromatographie van urine van een rat met gemerkt corticotrophine ingespoten, werden in het butanol-dioxaan ammonia systeem vier toppen met resp. een R_f van 0, 04-0, 10; 0, 25-0, 28; 0, 47-0, 50 en 0, 58-0, 64 onderscheiden.

Na chromatographie in hetzelfde systeem van urine waarin corticotrophine was toegevoegd, ontstonden steeds de eerste en de derde top. De tweede top kwam niet op elk chromatogram voor. Ten dele zal dit te wijten zijn aan het feit dat de eerste top zich niet steeds over eenzelfde gebied verspreidde, terwijl de mogelijkheid ook niet uitgesloten is, dat in lang bewaard gemerkt corticotrophine een product afgesplitst wordt, dat in het chromatogram een gelijke R_f heeft. De vierde top ontstond nooit bij chromatographie van urine + gemerkt corticotrophine.

NaJ in hetzelfde systeem gechromatographeerd had een R_f van 0, 47-0, 50. Met behulp van de bovenbeschreven techniek bleek, dat minstens 91 % van de radioactiviteit in deze top toegeschre-



Figuur IX
Verdeling van de radioactiviteit in een chromatogram, gemaakt van urine waaraan corticotrophine* was toegevoegd en urine van een rat die ingespoten was met corticotrophine*.
Gebruikte chromatographie systeem dioxaan-butanol-ammonia.

ven moet worden aan de aanwezigheid van gemerkte jodiden. De eerste top (R_f 0,04-0,10) in het chromatogram waarop urine + gemerkt corticotrophine was aangebracht, bleek voor 92 % de eigenschap met het ongejodeerde corticotrophine gemeen te hebben om bij een hoge pH neer te slaan en bij een lage pH op te lossen.

In het chromatogram van de urine van een rat ingespoten met gemerkt corticotrophine bleek, dat slechts 1,4 % van de radioactiviteit in deze top deze eigenschap had.

De tweede en vierde top hadden dezelfde Rf's als resp. diiodotyrosie en thyroxine. Met behulp van de isotoopdilutie techniek bleek, dat deze laatste top niet aan thyroxine toegeschreven mocht worden. Over de diiodotyrosine top konden wij hieromtrent geen zekerheid verkrijgen.

De hoeveelheid radioactiviteit in de chromatogrammen gemaakt van urine van ratten ingespoten met corticotrophine* en van urine waaraan corticotrophine* was toegevoegd, werden onderling vergeleken. In het eerste chromatogram was de hoeveelheid radioactiviteit in de jodiden top vergeleken ten opzichte van de hoeveelheid radioactiviteit in de rest van het chromatogram steeds groter dan in het tweede.

TABEL XIV

Radioactiviteit in verschillende urine-fracties en in de blaas, bepaald op verschillende tijden na een i.v. injectie van corticotrophine* en J^{131} en na toevoeging van deze preparaten aan resp. serum en urine (radioactiviteit uitgedrukt als percentage van de totale hoeveelheid radioactiviteit in de verzamelde urine).

Tijd in min.	Preparaat	Thio. %	Chloroform. %	Urine-rest %	t.c.a. %	„Corticotrophine" %	Blaaswand %
10	Corticotrophine*	45	-	37	21	7	12
40	"	49	-	38	14	6	22
60	"	53	-	34	8	8	53
60	J*	89	-	16	1	-	63
-	Corticotrophine* + serum	14	-	7	82	92	-
-	J* + urine	84	-	13	3	-	-
-	"	83	-	14	2	-	-

Radioactivity in several urine-fractions and in the bladder, measured at different times after an i.v. injection of corticotrophin* and J* after adding these preparations to resp. serum and urine. (radioactivity expressed as percentage of the total amount of radioactivity in the collected urine).

Na kleuring met ninhydrine bleken bij chromatographie in het butanoldioxaan-ammonia systeem de tweede en vierde top overeen te komen met resp. diiodotyrosine en thyroxine. Wat thyroxine betreft berust dit zeer waarschijnlijk op een toevalligheid (vide supra).

Zoals uit tabel XIV blijkt neemt de uitscheiding van de met trichloorazijnzuur praecipitabele fractie 10 minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine niet meer toe.

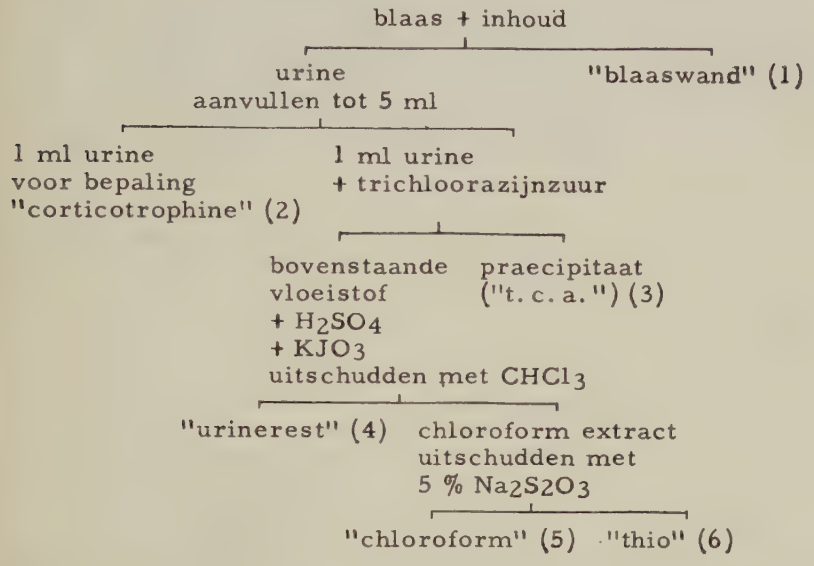
In de thiosulfaat oplossing en in de urinerest werden toenemende hoeveelheden radioactiviteit gevonden. In alle drie urineporties van de ratten, die met corticotrophine* ingespoten waren, had een klein gedeelte van de daarin voorkomende hoeveelheid radioactiviteit de bovengenoemde eigenschap met corticotrophine gemeen.

De blaaswand blijkt 60 minuten na de injectie 1/3 van de totaal gemeten radioactiviteit te bevatten.

Bij de ratten aan welke J^{131} werd toegediend, bleek 60 minuten na de injectie hiervan 89 % van de totale in de urine gevonden radioactiviteit in de thio oplossing voor te komen. Het overige gedeelte werd voornamelijk in de urinerest teruggevonden. In de urine waaraan J^{131} was toegevoegd werden over de verschillende fracties ongeveer gelijke percentages teruggevonden. Van het gemerkte corticotrophine werd het grootste gedeelte als „cortico-

TABEL XIVa

Gevolgde methodiek voor de analyse van blaas + inhoud van ratten ingespoten met corticotrophine* of J*.



Methods followed for the analysis of the bladder and its content of rats injected with labelled corticotrophin, resp. iodide.

trophine" geidentificeerd en bleek ook het grootste gedeelte trichloorazijnzuur praecipitabel te zijn.

Discussie

De schildklier- en nierclearance voor jodiden ligt in dezelfde orde van grootte (Blom 1954).

Zoals uit tabel V, hoofdstuk III blijkt, worden er in de nier geen jodiden geconcentreerd. Hieruit volgt, dat de hoeveelheid in de urine voorkomende jodiden gelijk moet zijn aan de hoeveelheid jodiden die zich naar de schildklier begeven.

Zoals uit fig. VII blijkt bevat de blaas het tienvoudige van de activiteit die in de schildklier teruggevonden wordt. Dit kan er dus een aanwijzing voor zijn, dat een gedeelte van de in de blaas voorkomende radioactiviteit afkomstig is van het gemerkte corticotrophine of zijn afbraakproducten. Dit laatste kon bevestigd worden door de uitgescheiden urine te chromatograferen. Uit deze chromatogrammen bleek, dat niet alle radioactiviteit die één uur na de injectie in de urine gevonden wordt, toegeschreven moet worden aan jodiden.

Het grootste percentage van de hoeveelheid radioactiviteit die in de urine gemeten werd, komt in de thiosulfaat-oplossing voor. Deze radioactiviteit is afkomstig van jodiden. Verder zal een ge-

deelte van de radioactiviteit die in de blaas achterbleef ook aan jodiden toegeschreven moeten worden: immers op dezelfde tijd na injectie van J^{131} wordt in de blaaswand een ongeveer even groot percentage teruggevonden. Bij de eerste stap van de identificatie van de in de urine voorkomende anorganische jodiumverbindingen worden de daarin aanwezige jodiden in vrij jodium omgezet. Deze laatste zullen zich vrij gemakkelijk binden met de organische stoffen, die in het urinemengsel aanwezig zijn. Een gedeelte van de activiteit die in de urinerest aanwezig is, zal dus van jodiden afkomstig zijn. Van de urine, waaraan J^{131} is toegevoegd, blijkt de urinerest ruim 10 % van de totale activiteit te bevatten.

De hoeveelheid jodiden* die in werkelijkheid door de nier uitgescheiden worden, zal dus zeer waarschijnlijk groter zijn dan door de thio oplossing aangegeven wordt. Aangezien de schildklier- en nierclearance voor jodiden ongeveer gelijk is, moeten deze jodiden in de nier uit corticotrophine* gevormd zijn.

De urinerest van de ratten ingespoten met corticotrophine* bevat een groter percentage aan radioactiviteit dan dezelfde fractie van de urine van ratten ingespoten met J^{131} en van de urine waaraan J^{131} is toegevoegd. Een gedeelte van de radioactiviteit van deze fractie is dus zeer waarschijnlijk geen jodide en is niet met trichloorazijnzuur te praecipiteren. Met welke toppen op het chromatogram de activiteit in deze fractie samenviel, werd niet nagegaan. Of het gedeelte van de uitgescheiden radioactiviteit dat met corticotrophine overeenkwam, ook nog biologisch actief was, werd niet nader bestudeerd.

Het gewicht van de nieren van de door ons gebruikte ratten varieerde van 1,2 tot 1,4 gram. Zoals uit fig. VII blijkt bevat 100 mg nier 20 en 60 minuten na de injectie van corticotrophine* resp. 5200 en 1650 c.p.m. De totale activiteit in de nier op deze tijden na de injectie mag dus bij benadering op resp. 12 x 5200 c.p.m. en 12 x 1650 c.p.m. gesteld worden. Gedurende deze periode is er dus een verval in de nier van 12 x 3550 c.p.m. = 42600 c.p.m. In deze tijd werd er met urine 20200 c.p.m. — 10800 c.p.m. = 94.00 c.p.m. uitgescheiden.

Hieruit blijkt dat niet alle in de nier terecht gekomen radioactiviteit met de urine uitgescheiden wordt.

Een gedeelte (42600 c.p.m. — 9400 c.p.m. = 33200 c.p.m.) moet dus weer naar het bloed teruggeresorbeerd zijn.

Het grootste gedeelte van de radioactiviteit die in de nier terecht komt wordt dus naar het bloed teruggeresorbeerd. Een kleiner gedeelte wordt als anorganisch jodium (vide supra) met de urine uitgescheiden. De uitscheiding van met trichloorazijnzuur praecipitabele jodiumverbindingen is geen constant verschijnsel, maar geschiedt blijkbaar alleen kort na de injectie.

Conclusie

Een gedeelte van de radioactiviteit die zich na de injectie van gemerkt corticotrophine in de nier bevindt, wordt reeds in het eerste uur na de injectie naar het bloed teruggeresorbeerd. Een kleiner gedeelte wordt met de urine uitgescheiden. De radioactiviteit die met de urine uitgescheiden wordt is afkomstig van

meerdere producten. Direct na de injectie verschijnt een met trichloorazijnzuur praecipitabele fractie in de urine. De hoeveelheid radioactiviteit, die met deze fractie uitgescheiden wordt, neemt 10 minuten na de injectie niet meer toe. Het grootste percentage van de in de urine uitgescheiden activiteit komt hierin voor als jodiden. Het kleinste gedeelte hiervan zal afkomstig zijn van de uitscheiding van jodiden die zich in de circulatie bevinden; het overige gedeelte moet toegeschreven worden aan jodiden die bij de afbraak van gemerkt corticotrophine in de nier zijn ontstaan.

Hoofdstuk VIII

LOCALISATIE VAN GEMERKT CORTICOTROPHINE IN DE NIER

Inleiding

De nier vormt een barrière tussen het bloed en de urine, met het gevolg dat van de plasma eiwitten slechts minimale hoeveelheden in de urine verschijnen.

Wearn en Richards (1924) konden in het glomerulus filtraat van de kikker geen eiwit aantonen, indien er een snelle bloedstroom door de glomerulusvaten bestond. Met hun bepalingsmethoden waren zij niet in staat om concentraties kleiner dan 50 mg per 100 ml te meten.

Walker c.s. (1941) toonden in 16 van 41 glomerulus filtraten van ratten en cavia's eiwit aan. In 17 van de 25 negatieve gevallen kon met de gebruikte techniek minimaal 80 mg per 100 ml bepaald worden; in de overige 9 gevallen was de benedengrens 30 mg per 100 ml. Zij verbinden hieraan de conclusie, dat de glomerulus vloeistof geen eiwit bevatte, of althans in zeer kleine hoeveelheden.

In 1944 in een Harvey-lecture concludeert Oliver, dat het geenszins uitgesloten is, dat er onder physiologische omstandigheden een glomerulaire filtratie en tubulaire resorptie van eiwit plaats heeft. De bovengenoemde experimenten zijn volgens Oliver op zichzelf weinig zeggend, omdat alleen hoeveelheden eiwit groter dan 25 mg % aangetoond konden worden. Indien nl. het glomerulaire filtraat bij de rat slechts een eiwit concentratie van 1/1000 van de plasma concentratie heeft, dus 7 mg per 100 ml, moet de blaasurine reeds 600 mg eiwit per 100 ml bevatten, indien er geen terugresorptie van eiwit zou plaats vinden. De door Nussbaum in 1878 bij kikkers uitgevoerde experimenten pleitten er reeds voor dat het eiwit dat in de urine verschijnt de nier via de glomerulus passeert.

De kikkernier heeft een dubbele bloedvoorziening en wel door de arterie renalis, die de glomeruli van bloed voorziet, en de vena porta renalis waardoor het bloed de tubulicellen bereikt. Onderbinding van de eerste, voorkwam het ontstaan van albuminurie na toediening van ei-eiwit, terwijl in dat geval de ureumuitscheiding ongestoord doorging.

Bieter (1931) kon bij dieren met aglomerulaire nieren geen proteinurie veroorzaken.

Ekehorn (1931) vond, dat indien de blaasurine van een kikker eiwit bevatte, de eiwitconcentratie in de glomerulus urine steeds groter was. In enkele gevallen waarin geen eiwit in de blaasurine voorkwam, kon deze onderzoeker dit wel in het glomerulus punctaat aantonen. Zijn conclusies uit deze gegevens zijn tweeërlei:
1) het glomerulus membraan is voor eiwitten doorlaatbaar,
2) de tubuluscellen resorberen eiwit.

Dit laatste werd afgeleid uit het feit, dat de eiwitconcentratie in het glomerulus filtraat steeds groter was dan in de blaasurine. Wanneer geen terugresorptie van eiwit in de tubuluscellen plaats vindt, zou de eiwitconcentratie in de blaas groter moeten zijn, omdat in het tubuluslumen water teruggeresorbeerd wordt. Andere argumenten voor het bestaan van een terugresorptie van eiwitten zijn af te leiden uit de experimenten van Newman c.s. (1932) en Lichty c.s. (1932). Indien na i.v. injecties van haemoglobine een aanzienlijke tijd een haemoglobinurie had bestaan, zagen deze onderzoekers, dat er een ijzerhoudend pigment in de cellen van het proximale gedeelte van de tubuli verscheen. Dat deze opname door de tubuluscellen vanuit het tubuluslumen plaats heeft en niet rechtstreeks vanuit de bloedbaan, wordt zeer waarschijnlijk door de volgende experimenten. Door de art. renalis van de kikker en salamander te onderbinden en daarna bij deze dieren eiwit of colloidale kleurstoffen in te spuiten, konden Gerard (1936) en Lambert (1937) het opnemen van deze stoffen door de tubuluscellen verhinderen. Deze onderzoekers zagen tevens dat er een verband was tussen het moleculair gewicht van de ingespoten stof en de plaats in de tubuli waar dit eiwit teruggeresorbeerd werd.

Lison (1937) bewees door bij padden met een onderbonden arterie renalis kleurstof in het tubuluslumen te brengen, dat de potentie van de tubuluscellen om deze stoffen na onderbinding op te nemen, bleef bestaan.

Met behulp van histochemische bepalingsmethoden zagen Oliver c.s. (1954) na eiwitinjecties druppelvorming in de cellen van de proximale tubuli contorti. Deze druppelvorming trad op, varierende van 2 tot 18 uur na de intraveneuze of intraperitoneale toediening van het eiwit.

De totale hoeveelheden eiwit die nodig waren om deze druppelvorming te doen ontstaan, varieren van eiwit tot eiwit. Oliver zag de meeste en grootste druppels ontstaan na toediening van ei-eiwit. Aanzienlijke hoeveelheden rattenserum moeten gedurende een lange tijd toegediend worden alvorens zich druppels in de tubuluscellen vormen.

De andere door deze onderzoekers gebruikte eiwitten, kristallijn ovalbumine, paardenserum en bovine serum albumine lagen, wat de benodigde hoeveelheden betreft tussen deze eerstgenoemde eiwitten in. Nadat deze druppels ontstaan zijn, verdwijnen zij ook weer met verschillende snelheid, afhankelijk van de aard van het ingespoten eiwit. De druppels die gezien worden na injectie van rattenserum verdwijnen het snelst; die welke waargenomen worden na toediening van ei-eiwit, daarentegen veel langzamer.

De druppels die zich in de cel gevormd hebben, zijn evenals mitochondriën met Janus-groen te kleuren.

Het ingespoten eiwit neemt zelf deze kleurstof niet op.

Indien de preparaten 10 tot 15 minuten blijven staan, verandert de kleur in de druppels van groen naar rood. Deze waarneming wordt toegeschreven aan het reducerend vermogen van enzymen, die in de mitochondriën voorkomen.

Volgens Oliver zijn de gevormde druppels samengesteld uit het ingespoten eiwit en delen van de mitochondriën die zich in de cel bevinden.

Zoals deze onderzoekers konden aantonen, wordt de druppelvorming voorafgegaan door een diffuse verspreiding in de cel. Het bleek nl., dat 15 minuten na toediening van haemoglobine resp. ei-eiwit, een benzidine resp. Millon's reactie een van intensiteit wisselende diffuse kleuring van de proximale tubuluscellen gaf.

Schiller c.s. (1953) dienden intraveneus aan ratten albumine toe waaraan fluoresceine gekoppeld was. In tijden wisselend van twee uur tot 23 dagen na de injectie van dit gemerkt albumine werd de verdeling in het organisme van de rat bestudeerd. De ingespoten stof werd in de lumina van het proximale gedeelte van het nephron gelocaliseerd en niet in de verzamelbuisjes. In enkele tubuluscellen werd de merkstof waargenomen.

Het interesseerde ons in hoeverre onze waarnemingen met gemerkt corticotrophine tot het hierboven beschreven mechanisme terug te voeren waren.

Fitzgerald c.s. (1952, 1953) schrijven in enkele overzichtsartikelen over autoradiografische methodieken, dat na toediening van gemerkte hypophyse-hormonen de autoradiogrammen van de nieren een duidelijke concentratie van de radioactiviteit in de cellen van de tubulus contorti laten zien.

Volgens Sonenberg c.s. (1951a) geven, na toediening van gemerkt corticotrophine, andere weefsels dan de bijnier en schildklier geen positieve autoradiogrammen. Na toediening van gemerkt prolactine (Sonenberg 1951b) wordt het isotoop in het ovarium, in de schildklierfollikels en in de cellen van de tubulus contorti van de nier gelocaliseerd. Er bestaat dus in de literatuur geen zekerheid over de vraag of corticotrophine in het nierparenchym gelocaliseerd wordt en in hoeverre het gemerkt corticotrophine aan de cellen in dat orgaan gebonden wordt.

Om een nader inzicht te verkrijgen in dit probleem werden door ons een aantal experimenten uitgevoerd. Daarbij stellen wij ons de volgende vragen:

1) op welke plaatsen in de nier wordt dit op verschillende tijden na de injectie gelocaliseerd? M.a.w.: is het na te gaan, of corticotrophine dezelfde weg in de nier volgt als andere eiwitten?
2) In hoeverre wordt gemerkt corticotrophine aan het nierparenchym gebonden.
3) kan de opname van een gemerkt eiwit in de rattennier geremd worden door een stof, waarvan het bekend is, dat deze van invloed kan zijn op de nier-functie of is het mogelijk door toediening van grote hoeveelheden eiwit de opname te beinvloeden?

ad 1 Teneinde een antwoord te krijgen op de vraag: Waar corticotrophine in de nier gelocaliseerd wordt, werden op verschillende tijden na de injectie van gemerkt corticotrophine, autoradiogrammen gemaakt van niercoupes.

ad 2 Om nadere gegevens te verkrijgen omtrent de mate waarin het corticotrophine in de nier gebonden is, werd dit orgaan doorstroomd met een vloeistof die geen radioactiviteit bevatte.

ad 3 Wij trachtten dit concentratievermogen van de nier te beinvloeden door de dieren voor te behandelen met respectievelijk benemid [para(di-n-propylsulfamyl)-benzoëzuur] en een alkalisch eiwit hydrolysaat, bereid volgens Bing.

Bing c.s. (1946 en 1951) zagen na toediening van dit eiwit hydrolysaat aan ratten duidelijke morphologische veranderingen in de nieren van deze dieren ontstaan.
Voor dit laatste experiment gebruikten wij geen gemerkt corticotrophine maar gemerkt thyreotroophormon. In hoofdstuk III werd gezien, dat ongeveer een gelijke verdeling in het lichaam van gemerkt corticotrophine en gemerkt thyreotroop hormon werd gevonden.

Methodiek

ad 1 Autoradiographie: Bij een aantal ratten werd gemerkt corticotrophine toegediend. Voor de gebruikte methodiek zij naar hoofdstuk II en III verwezen.

Op verschillende tijden (varierende van 10 sec. tot 13 uur) na de injectie werden de ratten gedood. Van de nieren van deze ratten werden autoradiogrammen gemaakt volgens de door Belanger (1950) beschreven techniek. Het weefsel werd gefixeerd gedurende 2 uur in 96% alcohol: neutrale formaline = 9 : 1. Daarna ontwaterd met Dioxaan 2 uur; 1 uur; 1 uur; en overgebracht in paraffine.

Voor het snijden van de coupe werd het weefselblokje met een laagje paraffine bedekt, waardoor het strekken van de coupes op water vermeden kon worden (Holt c.s. 1949). Als photographische emulsie werd de Ilford G. 5 emulsie in gel. vorm gebruikt. Nierweefsel van een rat die niet met gemerkt eiwit was ingespoten, werd tezamen met de nieren die corticotrophine bevatten, in dezelfde vloeistof gefixeerd.

ad 2 Doorstroming: Bij twee groepen van vier ratten werden resp. 5 en 20 minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine een injectienaald in de aorta abdominalis gebracht en de aorta hierboven afgebonden; tegelijkertijd werd de linkernier aan de hilus onderbonden en de aorta en vena cava inferior onder de aftakkingen van de niervaten. Er werd een canule in de vena cava inferior geplaatst, waardoor de perfusievloeistof wegliep. Gedurende deze periode kregen de ratten een urethaannarcose. Het gebied tussen de beide aorta ligaturen werd gedurende 10 minuten met een Ringerse vloeistof, waaraan 0,4 % citraat was toegevoegd, doorstroomd. De temperatuur van de vloeistof was ca 34° C; er werd doorstroomd onder een druk van 100 mm Hg. De hoeveelheid doorstromingsvloeistof bedroeg ongeveer 6 ml/min.; 30 sec. voor het beeindigen van het experiment werd 1 ml van een 10 % methyleenblauwoplossing door de injectienaald in de aorta gespoten om te controleren of de rechter nier wel en de linker nier niet doorstroomd was.

De hoeveelheid radioactiviteit werd in beide nieren gemeten.

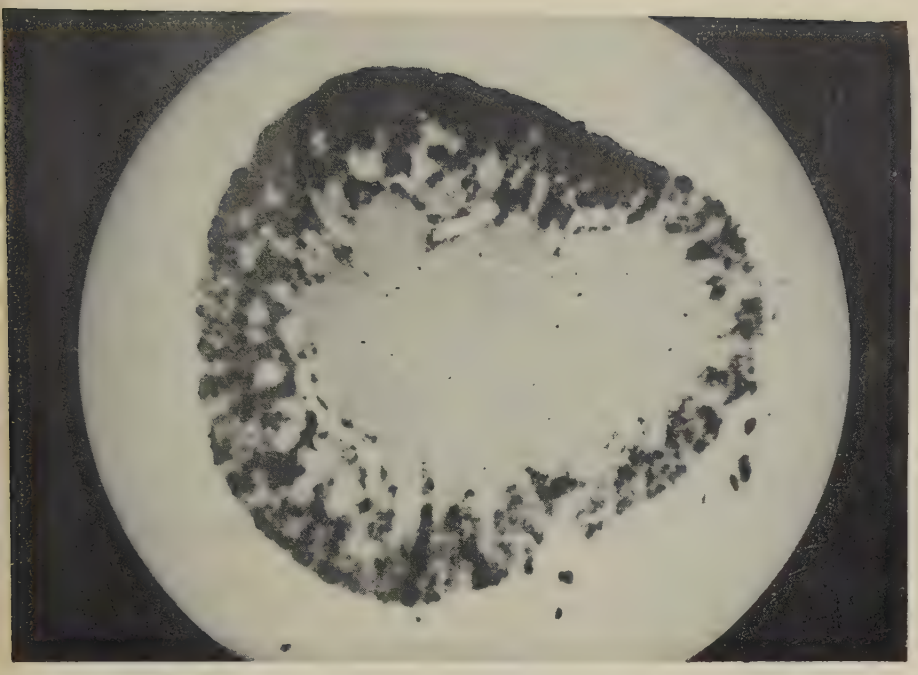
ad 3 Remming: Bij twee groepen van vijf ratten werd 12,5 mg van het Na-zout van benemid i.v. ingespoten. Een half uur na deze injectie kregen deze ratten een i.v. injectie met gemerkt corticotrophine; 20 en 60 minuten na de tweede injectie werden de dieren gedood en de radioactiviteit in het bloed, de nier en de blaas gemeten. Op dezelfde tijd na de corticotro-

phine* injectie werd de radioactiviteit in dezelfde weefsels van niet met benemid behandelde ratten gemeten.
In twee afzonderlijke experimenten (Ia en IIa) kregen twee groepen van zes ratten gedurende resp. 18 en 28 dagen twee verschillende hoeveelheden (resp. 1,5 ml en 4 ml) van een serum hydrolysaat intraperitoneaal ingespoten. Het serum hydrolysaat werd bereid volgens Bing (1946). Dit serum hydrolysaat werd bereid door aan een hoeveelheid humaan serum een gelijk volume 1 N NaOH toe te voegen. Dit mengsel werd gedurende 18 uur bij kamertemperatuur bewaard; daarna werd het met een 1 N HCl oplossing geneutraliseerd. Het zout werd door dialyse verwijderd. Twee groepen controleratten (Ib en IIb) kregen gedurende dezelfde periode 0,9 % NaCl toegediend. Op de laatste dag van de injectie kregen deze ratten een i.v. injectie (0,4 ml) met gemerkt thyreotroop hormon (7 Junkmann-Schoeller eenheden = 1,5 mg); 10 minuten na de injectie werd de radioactiviteit in het bloed en de nieren gemeten. Van het nierweefsel werden histologische coupes gemaakt; deze werden met haematoxiline-eosine gekleurd.

Resultaten

ad 1 Autoradiographie: 20 minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine blijkt de radioactiviteit in de nieren, vnl. in de schors gelocaliseerd te zijn (fig. X). In de glomeruli wordt echter geen duidelijke radioactiviteit waargenomen (fig. XI). Uit een nog sterkere vergroting (fig. XII) blijkt het gebied waar de meest intensieve zwarting heeft plaats gevonden, overeen te komen met het gebied waar de proximale tubuli contorti gelocaliseerd zijn. Op de plaats van de lager gelegen gedeelten van het nephron wordt minder radioactiviteit waargenomen. Autoradiogrammen gemaakt 10 en 30 sec. en 1, 5 en 9 minuten na het begin van de injectie toonden dit zelfde beeld. Zelfs 10 sec. na het begin van de injectie werd er in de glomeruli minder radioactiviteit gevonden dan in de cellen van de proximale tubuli contorti.
De radioactiviteit was 13 uur na de injectie diffuus over het nierweefsel verspreid.
In de autoradiogrammen gemaakt van de controle nieren, werd uitsluitend aan de buitenrand enige radioactiviteit waargenomen, kennelijk door adsorptie van radioactief materiaal.

ad 2 Doorstroming: Na 10 minuten doorstroming van de rechter nier, bevat deze bij de 5 en 20 minuten van tevoren ingespoten ratten, resp. 77 % en 91 % van de activiteit die in de linker nier gevonden wordt.
Na doorstroming is het gewicht van de rechter nier toegenomen t.o.v. het gewicht van de linker nier.
In de histologische coupes gemaakt van doorstroomde nieren bleek het tubuluslumen uitgezet te zijn. Gedurende de doorstromingstijd werd er ca 3 ml urine gevormd.



Figuur X
Autoradiogram van een rattenniercoupe. Twintig minuten na een intraveneuze injectie van gemerkt corticotrophine.
(vergroting 15 x)

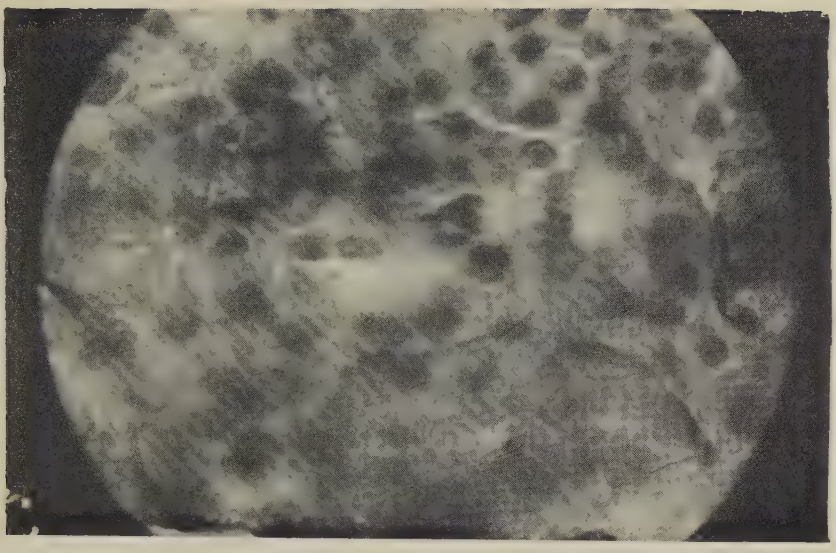
Figuur XI
Autoradiogram van een rattenniercoupe. Twintig minuten na een intraveneuze injectie van gemerkt corticotrophine.
(vergroting 200 x)

TABEL XV

De hoeveelheid radioactiviteit in doorstroomde en onderbonden nieren, 5 en 20 minuten na de injectie van corticotrophine* (de doorstromingstijd bedroeg 10 min.).

Tijd na inj. (min)	Gewicht onderbonden l. nier mg	Gewicht doorstroomde r. nier mg	C.p.m. doorstroomde nier	C.p.m. onderbonden nier
5	820	1115	7240	12807
5	760	1120	10719	11803
5	745	1010	19601	16578
5	748	1055	10063	10925
			$\bar{x}$ 11906	$\bar{x}$ 13028
20	725	1106	20118	24383
20	710	970	21718	29456
20	780	1036	19285	24943
20	815	1095	18115	24145
			$\bar{x}$ 19809	$\bar{x}$ 25732

Radioactivity in perfused and non-perfused kidneys, 5 and 20 minutes after injection of cirtocotrophin* (Perfusiontime: 10 min.).



Figuur XII
Autoradiogram van een rattenniercoupe. Twintig minuten na een intraveneuze injectie van gemerkt corticotrophine.
(vergroting 850 x)

ad 3 Remming: Zoals uit tabel XVI blijkt heeft benemid geen invloed op de hoeveelheid radioactiviteit die 20 en 60 minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine in het bloed, de nier en de blaas gemeten werd.
In de nieren van de ratten die gedurende 28 dagen met een alkalisch eiwit hydrolysaat ingespoten werden, worden histologisch duidelijke veranderingen waargenomen (fig. XIII en XIV).
In de proximale tubuli contorti hebben zich vacuolen van verschillende grootte gevormd. Bij een sterke vergroting blijkt het dat er in de periferie van vele cellen slechts een kleine hoeveelheid protoplasma te vinden is. Op verschillende plaatsen is de gehele tubulusstructuur verdwenen. De kernen vertonen een geheel normaal beeld. Aan lager gelegen gedeelten van het nephron worden geen duidelijke veranderingen waargenomen. De cellen van de Henlese lissen en van de distale tubuli contorti hebben een normaal aspect. Macroscopisch waren de nieren van de met het alkalisch eiwit hydrolysaat ingespoten ratten, groter, zwaarder (tabel XVII) en lichter van kleur dan de nieren van de controle dieren.
In de nieren van de ratten uit groep Ia werden overeenkomstige veranderingen waargenomen; deze waren echter minder intensief. In de totale nieren van deze beide groepen verschilde de hoeveelheid radioactiviteit gemeten 10 minuten na de injectie van 7 J.S.-eenheden gemerkt thyreotroophormon niet. De hoeveelheid radioactiviteit uitgedrukt per gram nier verschilde evenals de nier/bloed ratio significant ($p < 0,01$) in de beide groepen ratten van experiment II.

TABEL XVI

Het effect van 12,5 mg benemid op de concentratie van de radioactiviteit in het bloed, de nier en de blaas van ratten. (Benemid i.v. toegediend een half uur voor de i.v. corticotrophine* injectie).

Voorbehandeld met	Min. na injectie van corticotrophine*	Nier [1] (g) c.p.m. ± s.e.	Bloed [1] (ml) c.p.m. ± s.e.	Blaas [1] c.p.m. ± s.e.
benemid	20	38500 ± 3380	4160 ± 259	3350 ± 1560
0,9% NaCl	20	39000 ± 2410	4700 ± 492	5120 ± 2110
benemid	60	13750 ± 2910	3620 ± 372	14300 ± 2070
0,9% NaCl	60	13600 ± 1010	3910 ± 182	13750 ± 1660

The effect of 12,5 mg benemid on the concentration of the radioactivity in the blood, kidney and bladder of rats. (Benemid i.v. administrated half an hour before an i.v. injection of labelled corticotrophin).

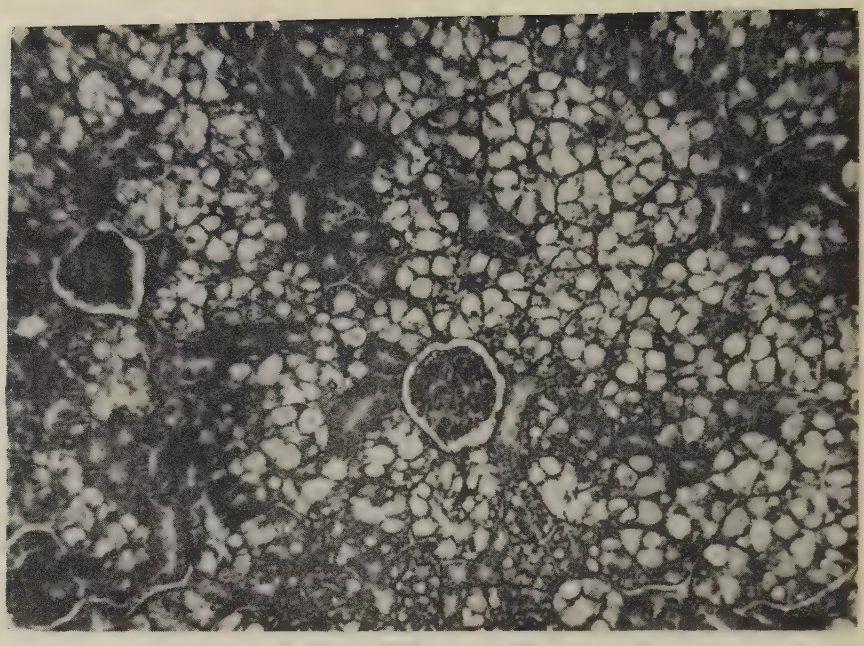
1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.
Mean of 5 observations.

TABEL XVII

Het effect van een voorbehandeling met humaan serum hydrolysaat op de concentratie van thyreotroop hormon in de nier van ratten. (Radioactiviteit gemeten 10 min. na een i.v. injectie van 0, 4 ml thyreotroop hormon*).

Exp.	Aantal	Dosis/d.d. hydrolysaat	Voorbehandelings dagen	Niergewicht (g)	Conc. per totale nier (c.p.m.)	Conc. per g nier	Nier g/bloed g
Ia	6	1, 5	18	1200	46×10^3	38×10^3	7, 7
Ib	6	saline	18	1100	45×10^3	41×10^3	7, 6
IIa	6	4, 0	28	1780	52×10^3	29.4×10^3	4, 2
IIb	5	saline	28	1300	60×10^3	46×10^3	7, 0

The effect of pretreatment with human serum hydrolysate on the concentration of thyrotrophic hormone* by the kidney of rats. (Measured 10 minutes after i.v. injection of 0, 4 ml thyrotrophic hormone*).



Figuur XIII
Vacuolisatie in de proximale tubuli contorti van de nieren na behandeling van ratten gedurende 28 dagen met een alkalisch eiwit hydrolysaat. Vergroting 100 x.

De nier/bloed ratio en de hoeveelheid radioactiviteit per gram nier, verschilt niet tussen de beide groepen van experiment I.

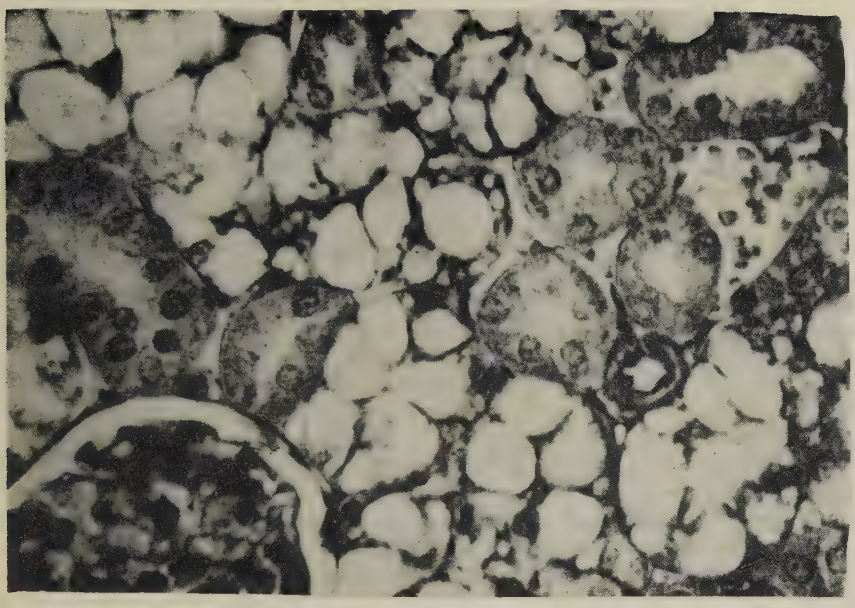
Discussie

Uit de gemaakte autoradiogrammen van de nier blijkt dat na injectie van gemerkt corticotrophine, radioactiviteit in de cellen van de proximale tubuli contorti teruggevonden wordt. Dit is in overeenstemming met de in de literatuur vermelde gegevens omtrent de localisatie van ingespoten eiwitten in de nier.

De diffuus verspreide radioactiviteit in de nieren van ratten, die 13 uur te voren met corticotrophine* waren ingespoten, zal aan J^{131} bevattende afbraakproducten van het toegediende gemerkte eiwit moeten worden toegeschreven.

De autoradiogrammen die op verschillende tijden na de injectie van gemerkt corticotrophine gemaakt zijn, geven geen inlichtingen over de weg waarlangs het gemerkte corticotrophine de tubuluscellen bereikt heeft. De meeste feiten wijzen erop dat corticotrophine* zeer waarschijnlijk door de glomerulus gefiltreerd zal worden. Hiervoor pleiten allereerst de literatuurgegevens over de weg die de eiwitten in de nier volgen (zie inleiding).

Het is bekend (Beyer c.s. 1951) dat benemid de tubulaire secretie remt; een uitzondering hierop vormt de uitscheiding door



Figuur XIV
Vacuolisatie in de proximale tubuli contorti van de nieren na behandeling van ratten gedurende 28 dagen met een alkalisch eiwit hydrolysaat. Vergroting 450 x.

de tubuluscel van N-methylnicotinamide. Deze enkele uitzondering is volgens onze mening een onvoldoende reden om zonder enige nadere bewijsvoering een tubulaire secretie van andere stoffen aan te nemen.

Na toediening van benemid aan patienten lijdende aan jicht, neemt de uitscheiding van uraten toe (Sirota c.s. 1952); dit zou geschieden doordat benemid de resorptie van uraten uit het tubuluslumen remt.

Het feit dat benemid de hoeveelheid radioactiviteit, die na injectie van gemerkt corticotrophine in de nier en de blaas gelocaliseerd wordt, niet beinvloedt, mag een aanwijzing zijn dat dit eiwit niet door de tubuluscellen gesecerneerd wordt.

De doorstroming van een nier blijkt van weinig invloed te zijn op de hoeveelheid radioactiviteit die in dit orgaan gevonden wordt. Hierbij moet er nog rekening mee gehouden worden dat gedurende de tijd dat de rechter nier doorstroomd wordt, de linker nier onderbonden is en dat daardoor gedurende deze periode eventueel gevormde radioactieve producten wel door de rechter en niet door de linker nier afgevoerd kunnen worden.

Een onvoldoende doorstroming van de rechter nier lijkt niet waarschijnlijk aangezien de hoeveelheid die per tijdseenheid door de nier ging ca drie maal de normale was. Gedurende de 10 minuten die de doorstroming duurde, werd er in de blaas bijna evenveel urine gevormd als een normale dagproductie van de rat is.

Het ingespoten corticotrophine moet dus hecht aan het nierparenchym gebonden zijn.

Na injectie van het eiwit hydrolysaat vinden we in de nier dezelfde morphologische veranderingen als door Bing beschreven zijn. Deze veranderingen zijn vnl. in de cellen van de proximale tubuli contorti gelocaliseerd. Deze cellen zien er gezwollen uit; het lijkt ons derhalve gerechtvaardigd om de gewichtstoename van deze nieren toe te schrijven aan een stapeling van het ingespoten product.

De per totale nier teruggevonden radioactiviteit zal derhalve een betere maat zijn om de hoeveelheid per eenheid nierweefsel gebonden eiwit uit te drukken dan de hoeveelheid radioactiviteit per gram nier.

Conclusie

Uit de boven beschreven experimenten lijkt het waarschijnlijk dat corticotrophine in de nier op dezelfde plaatsen als andere eiwitten gelocaliseerd is. Ook zijn er aanwijzingen waaruit kan blijken dat de weg die corticotrophine in de nier volgt niet verschilt met de weg die andere eiwitten volgen. Corticotrophine wordt zeer hecht aan het nierweefsel gebonden.

Na injectie van een eiwit hydrolysaat dat zeer duidelijk morphologische veranderingen in de nier te zien geeft, blijkt de eigenschap van de nier om thyreotroop hormon te binden niet te worden geblokkeerd.

Hoofdstuk IX

VERANDERING VAN HET VERDELINGSPATROON VAN GEMERKT CORTICOTROPHINE NA LANGDURIGE VOORBEHANDELING MET DIT HORMON

Inleiding

Tot dusverre zijn er, uitgezonderd enkele aandoeningen van de hypophyse, geen ziekten bekend die veroorzaakt worden door een tekort aan corticotrophine (Ingle c.s. 1953a; Bauer c.s. 1953). De gunstige werking die corticotrophine heeft op verschillende ziektetoestanden wordt veroorzaakt doordat na toediening van corticotrophine de bijnierschors meer hormonen produceert (Sandberg c.s. 1953; Querido c.s. 1954; Bayliss 1954). In het organisme ontstaan hierdoor een aantal veranderingen die toegeschreven kunnen worden aan het bestaan van een toestand van hypercorticisme. De symptomen waarmee deze veranderingen gepaard gaan waren te voorspellen op grond van waarnemingen, die in de pathologie en physiologie gedaan werden. Naast deze te verwachten reacties werden door verschillende onderzoekers (o.a. Goslings c.s. 1951; Hijmans 1952) na toediening van corticotrophine een aantal niet te verwachten verschijnselen waargenomen. Deze laatste kunnen op basis van de klinische verschijnselen die zij veroorzaken in drie groepen ingedeeld worden.

1) De verschijnselen die op kunnen treden direct na injectie van corticotrophine. Deze komen overeen met de symptomen die bij overgevoeligheidsreacties waargenomen worden. Volgens Brown (1952) zouden 2 % van de patienten die corticotrophine toegediend krijgen, overgevoeligheidsreacties zoals urticaria, angio-neurotisch oedeem en bronchospasmus vertonen.

De verhoogde productie van bijnierhormonen die na toediening van corticotrophine ontstaat, zou de patient in de meeste gevallen beschermen tegen deze anaphylactische reacties. Daardoor zouden bij patienten die een bilaterale adrenalectomie hebben ondergaan of waarbij een bijnierinsufficientie of panhypopituitarisme bestaat, frequentere overgevoeligheidsverschijnselen na toediening van corticotrophine optreden (Thorn c.s. 1953). Wilson (1951) zag 15 minuten na het begin van een intraveneus corticotrophine infuus bij twee patienten met de klinische symptomen van een panhypopituitarisme overgevoeligheidsreacties ontstaan. De beide patienten hadden gedurende deze periode 2 mg corticotrophine toegediend gekregen.

Onafhankelijk van de wijze van toediening worden deze overgevoeligheidsreacties waargenomen. Hill c.s. (1954) beschrijven een dodelijk verlopend geval na intramusculaire toediening.

Na toediening van corticotrophine-preparaten met een verlengde werking namen wij ook overgevoeligheidsverschijnselen waar. Het betreft hier een vrouw van 39 jaar lijdende aan een panvasculitis (Klin. 1170/50). Enkele keren na toediening van gewoon cortico-

trophine, reageerde patiente hierop met overgevoeligheidsreacties. Om de injectieplaatsen kreeg de patiente rode iets verheven maculae. Enkele keren werden er aan de buitenzijde van de bovenbenen jeukende efflorescenties waargenomen. Bij voortzetten van de therapie verdwenen deze overgevoeligheidsverschijnselen weer. Drie jaar na deze waarneming werd patiente met corticotrophine preparaten met een verlengde werking behandeld. Zes dagen na het begin van de corticotrophine-theràpie (acton prolongatum 10 I. U. /d. d.) vertoonde deze patiente duidelijke overgevoeligheidsverschijnselen: urticaria, oedeem en jeuk. Na toediening van anti-histaminica (phenergan) verdwenen deze verschijnselen binnen enkele uren.

Aangezien de klachten van de patiente steeds toenamen werd twee maanden later nogmaals een corticotrophine therapie ingesteld. Binnen het uur na de eerste corticotrophine-injectie (10 E cortrophine-Z) traden hevige allergische reacties op. De huid van de patiente was over het gehele lichaam sterk gezwollen en rood en vertoonde vooral op de armen duidelijke bulten. Ook de oogleden waren rood en gezwollen; de patiente had het zeer benauwd en kon niet meer spreken. Zij was misselijk en had hevige buikpijn. De gewrichten waren pijnlijk en stijf. Al deze symptomen verdwenen zeer snel na i. v. toediening van anti-histaminica en calcium. Hier dient vermeld te worden dat het optreden van panarteritis na toediening van corticotrophine is waargenomen (Hijmans 1954).

2) Een tweede groep van bijverschijnselen die niet aan een tot dusverre bekende werking van de bijniersteroiden toegeschreven kàn worden, wordt door Hijmans (1952) uitvoerig besproken. Deze onderzoeker vermeldt dat bij een aantal patienten na langdurige toediening van corticotrophine gelocaliseerde vaataandoeningen en stoornissen van de hartfrequentie ontstaan en dat door deze therapie een ongunstige invloed uitgeoefend wordt op bestaande nierlaesies. In de afgelopen jaren konden wij het samengaan van deze verschijnselen en van een corticotrophinebehandeling nog enkele malen waarnemen. Een oorzakelijk verband tussen deze aandoeningen en de corticotrophine therapie lijkt mogelijk.

3) Na langdurige toediening van corticotrophine bij patienten met een rheumatoide arthritis kan het effect op een corticotrophinebehandeling, nog tijdens de toediening van het hormon verminderen, totaal verdwijnen of in ongewenste verschijnselen omslaan (Goslings c.s. 1952; Hijmans 1952). De frequentie waarin dit minder gunstig effect gezien wordt, doet een causaal verband tussen de ingestelde therapie en de waargenomen reacties sterk vermoeden. De bovengenoemde onderzoekers onderwerpen dit zgn. resistentieprobleem aan een nauwkeurige analyse. Een aantal mogelijkheden die de oorzaak kunnen zijn van dit phenomeen worden door hen opgesomd. Op grond van de beschikbare gegevens kan echter omtrent een aantal wellicht bepalende factoren geen zekerheid worden verkregen.

Door ons werd getracht een nader inzicht te verkrijgen over de factoren die de resistentie t. o. v. de corticotrophine zouden kunnen geven.

Wij gingen na of het verdelingspatroon van corticotrophine* bij ratten verandert, wanneer de proefdieren langdurig met corticotrophine worden voorbehandeld. Hierbij moet worden vastge-

steld, dat de resultaten van deze experimentele studie geenszins rechtstreeks op de kliniek overgebracht mogen worden. Onze eerste restrictie berust op het feit dat het zogenaamde resistentie phenomeen niet bij alle patienten die met corticotrophine behandeld worden, wordt waargenomen; ten tweede is het geenszins bekend of deze verschijnselen ook bij proefdieren kunnen voorkomen.

Methodiek

Gedurende 64 dagen kregen 12 ratten 2 d.d./2,5 I.U. corticotrophine subcutaan toegediend. Op de laatste dag van de behandeling werden 5 I.U. gemerkt corticotrophine intraveneus ingespoten. 6 ratten werden 5 minuten na de injectie gedood, de overige, 20 minuten na de injectie. De radioactiviteit in het bloed, de nier, lever, spier en bijnier werd op de gebruikelijke manier gemeten.

Van twee groepen van vijf controle-dieren, die dus niet met corticotrophine voorbehandeld waren, werd na intraveneuze injectie van corticotrophine eveneens de radioactiviteit in bovengenoemde organen bepaald.

Om na te gaan of mogelijke veranderingen in het verdelingspatroon specifiek voor corticotrophine waren, of ook na toediening van andere eiwitten voorkomen, werden gedurende dezelfde periode 14 ratten subcutaan ingespoten met 2 dd./2,5 mg bovine serum albumine (Poviet).

Op de laatste dag van de behandeling kregen deze ratten vijf mg gemerkt albumine intraveneus toegediend. Tevens werden ook twee groepen van vijf ratten die niet met albumine voorbehandeld waren, met gemerkt albumine ingespoten. De dieren werden 5 en 20 minuten na de injectie gedood en de radioactiviteit in het bloed, de nier, de lever, de spier en de bijnier gemeten.

Resultaten

De hoeveelheid radioactiviteit in het bloed, de nier en de bijnier 5 en 20 minuten na toediening van gemerkt corticotrophine aan ratten, waarbij de 64 voorafgaande dagen twee maal daags 2,5 I.U. corticotrophine ingespoten werd, verschilt niet met de hoeveelheid radioactiviteit in dezelfde organen van onbehandelde ratten (tabel XVIII). Zowel 5 als 20 minuten na de injectie van gemerkt corticotrophine verschilt de hoeveelheid radioactiviteit in de levers van deze beide groepen ratten significant. De gevonden radioactiviteit in de spier van deze beide groepen verschilt 5 minuten na de injectie significant. Na injectie van gemerkt bovine serum albumine wordt er geen verschil gezien tussen de radioactiviteit in het bloed, de nier, bijnier, lever en spier van de voorbehandelde ratten en in dezelfde organen van hun controles.

Er was geen significant verschil tussen de gewichtstoename van de met corticotrophine en met albumine ingespoten ratten. De lichaamsgewichten van de ratten waren ca 250 g op het tijdstip dat het gemerkte eiwit werd ingespoten. De bijniergewichten van de ratten die 64 dagen met corticotrophine behandeld waren (54 mg $\pm$

TABEL XVIII

Verdeling van de radioactiviteit over verschillende weefsels van onbehandelde ratten en van ratten die gedurende 64 dagen voorbehandeld waren met corticotrophine (2 dd. 2,5 I. U.) en bovine serum albumine (2 dd. 2,5 mg), 5 en 20 minuten na toediening van corticotrophine* en bovine serum albumine*.

Groep	Tijd na inj. (min)	Aantal dieren	Bijnier c.p.m./g ± s.e.	Nier c.p.m./g ± s.e.	Lever c.p.m./g ± s.e.	Spier c.p.m./g ± s.e.	Bloed c.p.m./g ± s.e.
corticotrophine	5	6	2070 ± 261	18300 ± 1750	4882 ± 378 0,01 > p > 0,001	214 ± 39 0,01 > p > 0,001	4310 ± 332
controle	5	5	2490 ± 133	15700 ± 1030	3140 ± 298	418 ± 29	3063 ± 325
corticotrophine	20	6	1902 ± 50	19400 ± 892	4840 ± 358 0,01 > p > 0,001	224 ± 42	2771 ± 169
controle	20	5	2270 ± 313	23700 ± 1690	2998 ± 233		22496 ± 69
albumine	5	7	8690 ± 341	5014 ± 302	7094 ± 336	982 ± 56	19101 ± 230
controle	5	5	8442 ± 654	5428 ± 674	6442 ± 314	1380 ± 118	18243 ± 1060
albumine	20	7	6373 ± 481	4920 ± 354	6020 ± 299	769 ± 22	16626 ± 837
controle	20	5	6630 ± 190	5320 ± 567	5114 ± 191	881 ± 56	18457 ± 668

ingespoten: corticotrophine 379.000 c.p.m.
ingespoten: serum albumine 199.000 c.p.m.

Distribution of radioactivity 5 and 20 minutes after injection of corticotrophin* and bovine serum albumine* in untreated rats and rats treated during 64 days with corticotrophin (2 dd. 2,5 I. U.) and bovine serum albumine (2 dd. 2 mg).

4,8) verschilden significant ($p < 0,01$) met de bijniergewichten van de controlegroep (37 mg ± 2,3) en van de met albumine ingespoten ratten (34 mg ± 1).

Discussie

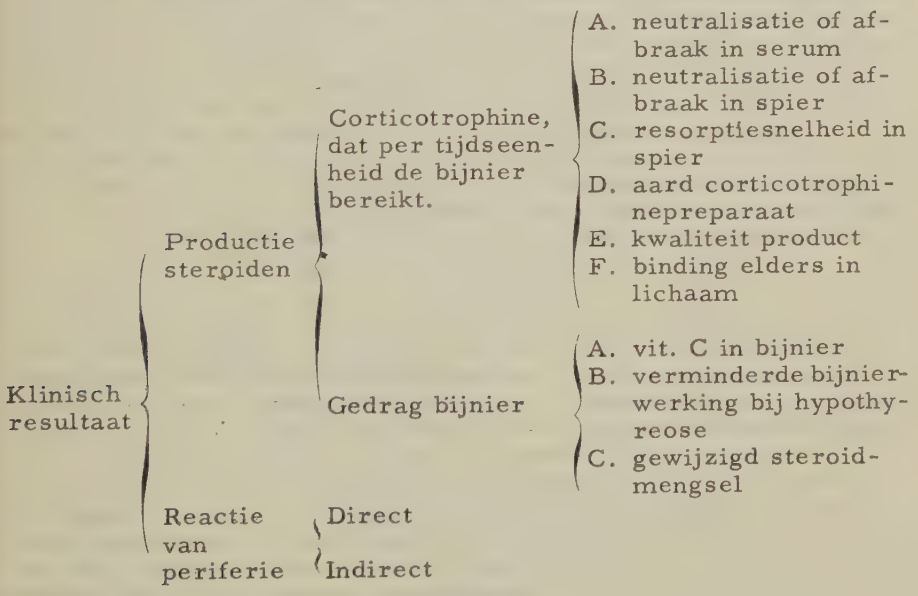
Bij de ratten die corticotrophine toegediend kregen is het gewicht van de bijnieren duidelijk zwaarder dan hij de controledieren en de met bovine serum albumine behandelde ratten. Dit maakt het zeer aannemelijk dat de bijniergewichten van de groep met corticotrophine behandelde ratten nog onder invloed van het toegediende corticotrophine staan. In hoeverre de aard en de hoeveelheid door de bijnier geproduceerd hormon veranderd was, werd niet nagegaan.

Uit deze gegevens kunnen we derhalve geen nadere inlichtingen krijgen over de vraag, of de oorzaak van het resistentie phenomeen gelegen kan zijn in een qualitatief of quantitatief gewijzigde hormonproductie van de bijnier.

Behalve een veranderd gedrag van de bijnier door langdurige toediening van corticotrophine kan volgens Goslings c.s. (1952) en Hijmans (1952) de oorzaak van het resistentie verschijnsel nog gelegen zijn in een veranderde reactie van de periferie op de geproduceerde steroiden of in een gewijzigde hoeveelheid corticotrophine die per tijdseenheid de bijnier bereikt (Schema II).

Deze laatste mogelijkheid willen wij hier aan een bespreking onderwerpen.

Schema II
Mogelijkheden van resistentie t.o.v. corticotrophine



Na toediening van corticotrophine* wordt er in de bijnieren van de met corticotrophine behandelde dieren en in de controle groep dezelfde hoeveelheid radioactiviteit gevonden. De hoeveelheid corticotrophine die per gewichtseenheid in het bijnierweefsel aanwezig is, verschilt in beide groepen niet. De hoeveelheid radioactiviteit per totale bijnier is bij de met corticotrophine voorbehandelde ratten 5 en 20 min. na de injectie resp. 0,030 en 0,026 % van de ingespoten dosis en bij de controledieren op dezelfde tijden na de injectie resp. 0,021 en 0,024 %. Deze verschillen zijn niet significant. Als de omzetting van de corticotrophine door de bijnieren van de ene groep sneller zou geschieden dan door de bijnieren van de andere groep, zal dit nog geen merkbare invloed hebben op het verdelingspatroon van gemerkt corticotrophine in het lichaam, aangezien de totale hoeveelheid die naar de bijnier gaat gering is t.o.v. de totaal ingespoten hoeveelheid gemerkt corticotrophine. De hier gebruikte proefopstelling kan ons geen verdere inlichtingen verstrekken omtrent de hoeveelheid corticotrophine die per tijdseenheid de bijnier bereikt.

Oliver c.s. (1954) kon na toediening van eiwitten, deze in de nieren van ingespoten ratten aantonen. In navolging van Bing zagen wij (zie hoofdstuk VIII) na de injectie van een eiwit-hydrolysaat afwijkingen in de tubuluscellen van de nier, die aan stapeling van deze eiwitten werd toegeschreven. Yuile c.s. (1941) zien na langdurige toediening van haemoglobine bij honden de nierdrempel voor dit eiwit dalen, d.w.z. dat bij honden, die gedurende 17 tot 21 dagen 1,5 g/d.d. haemoglobine ingespoten krijgen, reeds bij een plasma concentratie van ongeveer 60 mg/100 cc een haemoglobinurie optreedt. De uitscheiding van haemoglobine bij honden die een eerste injectie van haemoglobine kregen, heeft eerst plaats bij een plasma concentratie van 180 mg/100 cc. Willen zij deze toegenomen haemoglobine-excretie verklaren door aan te nemen, dat de glomerulus filtratie voor dit eiwit gelijk is gebleven, dan moet de terugresorptie-capaciteit van de tubuluscellen gedaald zijn. Zij berekenen de tubulaire terugresorptie van de behandelde honden op 1,66 mg/min. en van de controledieren op 3,38 mg/min. Deze honden werden ingespoten met haemoglobine, dat radioactief ijzer bevatte. Het bleek, dat 24 uur na de injectie in de nieren van de voorbehandelde honden een weinig meer radioactiviteit werd teruggevonden dan in de controledieren.

Voorbehandelde dieren	23,0 %	van de ingespoten dosis
	19,5 %	" " " "
Controles	15,3 %	" " " "
	17,3 %	" " " "

Deze onderzoekers achten het mogelijk, dat niet de tubulaire terugresorptie veranderd is, maar dat het beschreven phenomeen van de versnelde excretie aan een wijziging van de permeabiliteit van de glomeruli toegeschreven moet worden.

Directe argumenten hiervoor kunnen zij echter niet geven.

Na toediening van bovine albumine ziet Lippman (1948) de glomerulus verhoogd doorgankelijk. Bij gelijktijdige toediening van bovine albumine en haemoglobine verschijnt er meer haemoglobine in de urine. Ei-eiwit, ovalbumine en ovomucoid geven bij gelijktijdige toediening met haemoglobine geen verhoogde haemoglobinurie. In een latere publicatie (Lippman c.s. 1951) zien deze on-

derzoekers bij gelijktijdige toediening van bovine albumine en haemoglobine, naast de reeds vermelde toename van de glomerulaire filtratie-capaciteit voor haemoglobine, ook een verminderde terugresorptie in de tubulus.

Het blijkt dus mogelijk dat na parenterale injectie van eiwitten de glomerulus verhoogd doorlaatbaar wordt. Na intraperitoneale injectie van eiwitten ziet Addis (1949) bij ratten een proteinurie ontstaan. De aard van de proteinurie varieert met de aard en de hoeveelheid van het toegediende eiwit. Een eiwit met een klein moleculair gewicht, zoals het Bence Jones eiwit, verschijnt snel en in grote hoeveelheden in de urine.

In tegenstelling tot een homoloog eiwit als bv. rattenserum, waarvan grote doses gegeven moeten worden en dat dan nog slechts een matige proteinurie teweeg brengt.

De vraag rijst of na frequente toediening van corticotrophine dit mechanisme in werking treedt. Op grond van onze resultaten menen wij deze mogelijkheid te moeten verwerpen.

Bij een verhoogde doorlaatbaarheid (Yuile) zou de hoeveelheid radioactiviteit in de voorbehandelde ratten groter moeten zijn dan bij de controle dieren. Wanneer nu naast een verhoogde doorlaatbaarheid een verminderde terugresorptie-capaciteit zou bestaan (Lippman), zouden wij in de nieren van de voorbehandelde dieren minder radioactiviteit moeten terugvinden. Elke andere mogelijkheid om op basis van de boven vermelde hypothese onze getallen te interpreteren, lijkt ons niet verantwoord.

Het ontstaan van anti-lichamen tegen het ingespoten corticotrophine is een andere mogelijkheid die het ontstaan van een resistentie t.o.v. toegediend corticotrophine zou kunnen verklaren. De door Hijmans samengevatte literatuurgegevens geven zowel een aantal argumenten vóór als tégen deze mogelijkheid. Wij willen hier nagaan of het ontstaan van antilichamen in vivo met behulp van een toegediend gemerkt antigeen, ontdekt kan worden.

Talmage c.s. (1951) dienden met J^{131} gemerkt albumine toe aan tegen dit eiwit immuun gemaakte konijnen en hun controles. De hoeveelheid radioactiviteit verdwijnt bij de geimmuniceerde konijnen sneller uit het bloed dan bij de controle dieren. Het verschil is reeds direct na de injectie merkbaar.

Melchior c.s. (1953) vergeleken na toediening van gemerkt humaan serum albumine de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed, de nier, de lever en de milt van muizen waaraan antilichamen tegen dit eiwit toegediend werden met de radioactiviteit in deze weefsels van muizen waarbij geen antilichamen tegen het albumine aanwezig waren. Evenals Talmage c.s. vinden deze onderzoekers dat het gemerkte antigeen sneller uit de bloedbaan verdwijnt als er tevens specifieke antilichamen tegen dit eiwit in de circulatie zijn. Verder concluderen zij uit hun gegevens dat de hoeveelheid radioactiviteit in de lever en milt van de eerste groep muizen significant hoger ligt dan bij de tweede groep. De hoeveelheid radioactiviteit in de nier verschilt bij beide groepen niet.

Vergelijken wij deze literatuurgegevens met onze resultaten, dan kunnen wij hoogstens concluderen dat bij de met albumine behandelde ratten zich geen antilichamen tegen dit eiwit gevormd hebben. De waargenomen verschillen tussen het verdelingspatroon van de beide met gemerkt corticotrophine behandelde groepen la-

ten niet toe hieromtrent enige conclusie te trekken. Het is zeer wel denkbaar, dat behalve het voorkomen van antilichamen er mogelijkerwijs nog andere factoren (bv. een toestand van hypercorticisme) kunnen zijn die het verdelingspatroon van gemerkt corticotrophine kunnen beinvloeden. Daarbij komt, dat niet zoals bij de experimenten van Dixon, direct na de injectie een verschil in de hoeveelheid radioactiviteit in het bloed van beide groepen ratten waargenomen wordt. Voor het verklaren van de hier verkregen resultaten zijn verdere experimenten vereist.

Conclusie

Na langdurige behandeling van ratten met corticotrophine verandert het verdelingspatroon van het i.v. toegediende gemerkte corticotrophine. Het blijft een open vraag aan welk mechanisme deze veranderingen moeten worden toegeschreven.

Voor het ontstaan van een resistentie t.o.v. corticotrophine bij patienten met een rheumatoide arthritis, die gedurende een lange tijd met dit hormon behandeld worden, kan hier geen nadere verklaring gegeven worden.

AANHANGSEL

In de volgende tabellen worden de getallen weergegeven waarop de figuren I, II, IV, V en VII gebaseerd zijn. In deze tabellen is tevens de standaardfout van het gemiddelde (= s.e.) opgenomen.

Figuur I

Radioactiviteit op verschillende tijden na de injectie van gemerkte eiwitten en J^{131} (radioactiviteit uitgedrukt als % van de 20 min. waarde).

Preparaat:	Aantal Exp.[1]	1 min. % ± s.e.	5 min. % ± s.e.	10 min. % ± s.e.	15 min. % ± s.e.	20 min. %
corticotrophine*	5	327±35	213±10	140±10	107±1	100
bov. serum albumine*	3	87±14	108± 4	95± 9	98	100
serum. glob. (humane)*	1	159±20	117± 5	113± 6	87±6	100
ovalbumine*	1	180± 8	156±14	132±17	105±4	100
J*	4	113±16	100± 4	100± 3	100±2	100

1) Voor elk experiment werden 5 proefdieren gebruikt.

Figuur II

Radioactiviteit op verschillende tijden na de injectie van gemerkte hypophysepreparaten (radioactiviteit uitgedrukt als % van de 20 min. waarde).

Preparaat:	Aantal proef-dieren	1 min. % ± s.e.	5 min. % ± s.e.	10 min. % ± s.e.	15 min. % ± s.e.	20 min. %
ch. 37	5	288±26	153± 8	112±6	107±9	100
c.o.c.	5	471±78	177±15	117±3	113±4	100
onwerkzame hypophyse fractie	5	308± 4	165± 5	122±5	105±5	100
B.-prep.	5	293±11	140± 5	113±5	104±5	100

Figuur IV

Radioactiviteit in het bloed op verschillende tijden na de injectie van gemerkt corticotrophine bij ratten met onderbonden nieren en hun controles (radioactiviteit uitgedrukt als c.p.m.).

Tijd na injectie:	Ratten met onderbonden nieren [1]): c.p.m. ± s.e.	Controles [1]): c.p.m. ± s.e.
1	10536±417	9598±150
3	9104±355	6949±139
5	8464±444	5477±132
7	7933±318	4621± 75
9	7502±441	4254± 94
11	6922±360	4054± 85
13	6849±504	3876± 60
15	6523±401	3875± 22

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.

Figuur V

Radioactiviteit in het bloed op verschillende tijden na één en twee injecties van 5 I.U. gemerkt corticotrophine (radioactiviteit uitgedrukt in c.p.m.).

Tijd min.:	Groep A [1]) c.p.m. ± s.e.:	Groep B [1]) c.p.m. ± s.e.:	Groep C [1]) c.p.m. ± s.e.:
1	7846 ± 375		8276 ± 543
5	4010 ± 272		4701 ± 469
10	2620 ± 165		3044 ± 261
15	1848 ± 120		2332 ± 289
19	1636 ± 78		2054 ± 278
21	8570 ± 624	8782 ± 442	1958 ± 265
25	5608 ± 231	5064 ± 521	1914 ± 255
30	4376 ± 208	3670 ± 349	1892 ± 234
35	3634 ± 135	3000 ± 233	1822 ± 239
40	3168 ± 121	2424 ± 113	1861 ± 231

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.

Groep A ingespoten op t_o met 5 I.U. corticotrophine*
op t_{20} met 5 I.U. "
Groep B ingespoten op t_{20} met 5 I.U. "
Groep C ingespoten op t_o met 5 I.U. "
op t_{20} met 0,5 cc 0,9 % NaCl

Figuur VII

Radioactiviteit in de nier (0,1 g), schildklier (totaal) en blaas (totaal) op verschillende tijden na de injectie van gemerkt corticotrophine.

Tijd in min.:	Nier [1]: c.p.m./ 0,1 g ± s.e.	Schildklier [1]: c.p.m./ totaal ± s.e.	Blaas [1]: c.p.m./ totaal ± s.e.
7	5238 ± 580	548 ± 7	8296 ± 772
20	5210 ± 329	720 ± 85	10765 ± 1442
60	1652 ± 135	1810 ± 59	20190 ± 786
120	1408 ± 260	2344 ± 445	23230 ± 2580

1) Gemiddelde van 5 waarnemingen.

Legenda:

* = gemerkt

c.p.m. = counts per minute = aantal tellen per minuut.

I. U. = internationale eenheid.

SAMENVATTING

In dit proefschrift werd getracht nadere gegevens te verkrijgen ter beantwoording van de vraag wat er geschiedt met corticotrophine dat in de circulatie wordt gebracht. Hiertoe werd gebruik gemaakt van corticotrophine dat mèt J^{131} gemerkt werd. Aangezien de gebruikte corticotrophine preparaten een hoeveelheid hormonaal onwerkzame eiwitten bevatten, werd allereerst nagegaan in hoeverre onze waarnemingen betrekking hebben op het corticotrophine.

Er werd gevonden dat het verdelingspatroon van J^{131} en de verdwijning van de radioactiviteit uit het bloed van ratten na injectie van gemerkt corticotrophine overeenkwam met de in de literatuur bekende gegevens waarbij dit hormon langs biologische weg bepaald was. Uit deze overeenkomstige waarnemingen werd afgeleid, dat de gemeten radioactiviteit een goede maat was voor de hoeveelheid hormon.

Het verdelingspatroon van corticotrophine in het organisme van de rat bleek niet specifiek voor dit eiwit te zijn. Corticotrophinepreparaten, een onwerkzame hypophyse fractie, thyreotroophormon en een placenta eiwit worden in zeer sterke mate door de nier geconcentreerd. Dit orgaan bevat 20 min. na de injectie van deze eiwitten 12 tot 18 % van de ingespoten dosis (tabel IV, V en VII).

Van andere eiwitten als bovine serum albumine*, humaan γ globuline*, ovalbumine* en spier- en levereiwit* werden, evenals van de merkstof J^{131}, maximaal 3 % van de ingespoten dosis, in de nier gelocaliseerd.

Het feit dat de nier zulk een belangrijk aandeel in het metabolisme van corticotrophine heeft, maakte dat wij dit niermechanisme aan een nadere studie onderworpen hebben.

Na injectie van corticotrophine* bij ratten met onderbonden nieren daalde de radioactiviteit 1 - 5 min. na de injectie met een geringere snelheid dan bij hun controles (fig. IV, tabel VIII).

De eerste 5 min. na de injectie van corticotrophine* neemt de hoeveelheid radioactiviteit in de nier geleidelijk toe (fig. III).

Uit het feit dat na verloop van tijd de hoeveelheid J^{131} gebonden eiwit in het plasma vermindert en de hoeveelheid niet aan eiwit gebonden J^{131} toeneemt, werd tot een omzetting van het ingespoten product geconcludeerd (fig. VI, tabel XII). Door aan het plasma trichloorazijnzuur toe te voegen werd de aan eiwit gebonden J^{131} van de rest gescheiden.

De omzetting van gemerkt corticotrophine geschiedt volgens onze waarneming zeer waarschijnlijk met een geringere snelheid (halveringstijd van 40 - 50 min.) dan in de literatuur wordt aangenomen (5 - 6 min.). Onverklaard blijft hierbij de door Sayers gevonden halveringstijd van corticotrophine bij hypophyseloze en bijnierloze ratten die ca 1 minuut bedroeg.

De J^{131} bevattende producten die in de urine verschijnen werden met behulp van papierchromatografie en andere chemische methodes geanalyseerd. De hoeveelheid met trichloorazijnzuur

praecipitabel J^{131} in de urine werd als maat voor de hoeveelheid aan eiwit gebonden J^{131} genomen.

Op de papierchromatogrammen gemaakt van urine van ratten die met corticotrophine* waren ingespoten, werden behalve jodiden* drie andere radioactief Jodium bevattende verbindingen waargenomen. De identiteit van deze verbindingen kon niet vastgesteld worden. Een geringe hoeveelheid van de radioactiviteit die door de nier uitgescheiden wordt, komt in de urine als J^{131} gebonden eiwit voor. Van de radioactiviteit die met de urine uitgescheiden wordt, is ongeveer 50 % als jodiden^{131} aanwezig (tabel XIV).

Een gedeelte van de hoeveelheid radioactiviteit die in de nier geconcentreerd wordt, wordt naar het bloed teruggeresorbeerd. In autoradiogrammen gemaakt van nierweefsel van ratten ingespoten met gemerkt corticotrophine werd de grootste concentratie van de radioactiviteit in de nier in de tubulicellen gelocaliseerd. Er werd geen verschil in de localisatie van de radioactiviteit gezien in de nieren van ratten, die op verschillende tijden (variërend van 10 sec. tot 20 min.) na het begin van de injectie werden geseceerd.

Na toediening van benemid veranderde het concentratievermogen van de radioactiviteit in de nier en de uitscheiding daarvan met de urine niet van ratten die met gemerkt corticotrophine waren ingespoten (tabel XVI).

De hoeveelheid in de nier gelocaliseerde radioactiviteit werd hieruit na doorstroming vanuit de aorta met een Ringerse vloeistof niet verwijderd (tabel XV). Bij ratten waarbij door injectie met een eiwithydrolysaat, de nieren duidelijk morphologisch veranderd waren, werd per totale nier dezelfde hoeveelheid radioactiviteit gelocaliseerd als in de controlegroepen (tabel XVII).

De hoeveelheid radioactiviteit in de lever en spier wordt gewijzigd bij ratten die langdurig met corticotrophine voorbehandeld waren.

SUMMARY

Using I^{131} labelled corticotrophin preparations, the catabolism of exogenous corticotrophin in the rat has been studied. The corticotrophin preparations used contained a large amount of hormonal inactive protein material and therefore doubt arises whether conclusions on the metabolism of the hormone can be drawn from the results obtained. This however seems to be justified since our observations on the distribution pattern of I^{131} through the body of the rat, as well as the disappearance rate of radioactivity from the blood of rats after the injection of I^{131} labelled corticotrophin, are in close agreement with results obtained in the literature, using bioassay technique of the hormone.

The distribution pattern of corticotrophin* [1] in the organism of the rat was found to be aspecific for this hormone. All corticotrophin preparations tested but also a hormonal inactive hypophyseal protein fraction, thyrotrophic hormone preparations and a placenta protein fraction are concentrated in the kidney to such an extent that 20 minutes after the injection of these labelled proteins 12 - 18 % of the dose given is localised in this organ (table IV, V, VII).

From other proteins like bovine serum albumin, human γ globulin, ovalbumin and liver- and muscle proteins, as well as the I^{131}, only upto 3 % of the dose given was present in the kidney 20 minutes after their injection.

Since the kidney was found to have the highest corticotrophin* trapping capacity among the various organs tested, the mechanism by which this phenomenon is achieved was studied more extensively.

In experiments in which the disappearance rate of corticotrophin* from the bloodstream of rats was estimated, it was evident that after kidney ligation the drop in the I^{131} blood-level during the first 5 minutes after the injection was diminished (fig. IV, table VIII). During this period the concentration of I^{131} in the kidneys of normal rats increases gradually (fig. III).

The radioactivity in the non-protein bound I^{131} fraction in the plasma of rats measured at different times after the injection of corticotrophin* was found to increase gradually.

The half-life of corticotrophin* in the blood of rats has been calculated from these experiments and was found to be about 40 - 50 minutes. The discrepancy between this result and the values mentioned in the literature (5 - 6 minutes) have been discussed.

Only a small amount of the radioactivity excreted by the kidney was found to be present in urine in the form of protein bound I^{131} (= amount of trichloroacetic acid precipitable I^{131}).

The I^{131} containing compounds which are excreted in the urine were analysed by paperchromatography as well as by other chemical procedures. Paperchromatographic analysis revealed that besides iodide* three other I^{131} containing compounds are de-

1) All labelled compounds are indicated by an asteric.

monstrable (fig. VIII and IX). The identity of these compounds could not be established. About 50 % of the radioactivity which appears in the urine is present as free radioactive iodide (table XIV and XIVa).

From quantitative evaluation of our data the conclusion was drawn that the urinary I^{131} is due to catabolism of the corticotrophin* by the kidney. The radioactivity concentrated by the kidney is partly secreted into the bloodstream.

From autoradiographic studies performed on kidney tissue of rats injected with corticotrophin* it was evident that the highest concentration of I^{131} in the kidney is localized in the cells of the proximal tubuli (fig. X, XI, XII). No differences in the localisation of the radioactivity in the kidney were demonstrable in kidneys of rats, studied at various times (10 sec. - 20 min.) after the injection.

The corticotrophin* concentrating capacity of the kidney, as well as the excretion of I^{131} in the urine was not influenced by the previous administration of benemid (tabel XVI).

Perfusion of the kidneys with Ringers solution could not remove the corticotrophin* localised in the organ. The administration of a protein hydrolysate (Bing 1946), table XV, to rats resulted in extensive morphological changes of the kidney cortex (fig. XIII and XIV). In these animals the same amount of radioactivity after injection of thyrotrophic hormone was concentrated in the kidney as in control animals (table XVII).

The effect of prolonged corticotrophin pretreatment of the test-animals on the distribution of corticotrophin* through the organism of the rat has been studied. It was found that in these animals the amount of radioactivity localized in the liver and muscle was significantly altered (table XVIII). These differences are discussed.

LITERATUUR

ADDIS, T.: The mechanism of proteinuria. Proc. Nat. Acad. Sc., 35, 194, 1949.

ASTWOOD, E.B., RABEN, M.S., PAYNE, R.W. en GRADY A.B.: Purification of corticotropin with oxycellulose. J.Am.Chem. Soc., 73, 2969, 1951.

ASTWOOD, E.B., RABEN, M.S. en PAYNE, R.W.: Chemistry of corticotrophin. Recent Progr. in Hormone Res., 7, 1, 1952.

BAUER, W. en CLARK, W.S.: The relationship of the adaptation concept to the connective tissue diseases. Rec. Progr. in Hormone Res., 8, 217, 1953.

BAYLISS, L.E., KERRIDGE, P.M.T. en RUSSELL, D.S.: The excretion of protein by the mammalian kidney. J. Physiol., 77, 386, 1933.

BAYLISS, R.I.S. en STEINBECK, A.W.: The adrenal response to corticotrophin. Brit. Med. J. I, 486, 1954.

BELANGER, L.F.: A method for routine detection of radio-phosphates and other radioactive compounds in tissues. Anat. Rec. 107, 149, 1950.

BELL, P.H., e.a.: Purification and structure of β-corticotropin. J. Am. Chem. Soc., 76, 5565, 1954.

BEYER, K.H., RUSSO, H.F., TILLSON, E.K., MILLER, A.K., VERWEY, W.F. en GASS, S.R.: Benemid p-(di-n-propylsulfamyl)-benzoic acid: its renal affinity and its elimination. Am. J. Physiol., 166, 625, 1951.

BIETER, L.E.: Albuminuria in glomerular and aglomerular fish. J. Pharmacol. & Exper. Ther., 43, 407, 1931.

BING, J.: Histological changes after intraperitoneal injection of proteins and protein-hydrolysates. Acta path. et microbiol. Scandinav., 23, 540, 1946.

BING, J., SPERBER, I. en TEILUM, G.: Nephrosis-like renal changes and other effects of intraperitoneal injection of protein hydrolysate. Acta path. et microbiol. Scandinav., 29, 57, 1951.

BLOM, P.S.: Radioactive iodine studies in thyroid disease. Acta Endocrinol. Suppl., 21, 1954.

BLUM, F. en STRAUSS, E.: Ueber Jodbindingsfähigkeit und Konstitution der Proteinen. Z. Physiol. Chem., 112, 111, 1921.

BOEHM, R. en BERG, F.: Beitrage zur Pharmakologie des Jod. Arch. exper. Path. u. Pharmakol., 5, 329, 1876.

BROWN, E.N. en HOLLANDER, J.L.: Allergy to ACTH and the use of beef ACTH. Proc. of the sec. Clin. ACTH conf. II, 1951. Blakiston Co N.Y.

BRUCE, H.M., PARKERS, A.S. en PERRY, W.L.M.: Assay on ACTH on the thymus of the nestling rat. Lancet, 263, 780, 1952.

BUSH, Zie Liddle 1954.

COLLIP, J.B., ANDERSON, E.N. en THOMPSON, D.L.: The adrenotropic hormone of the anterior pituitary lobe. Lancet, 225, 347, 1933.

COONS, A.H., GREECH, H.J., JONES, R.N. en BERLINER, E.: The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. J. Immunol., 45, 159, 1942.
COONS, A.H. en KAPLAN, M.H.: Localization of antigen in tissue cells; improvements in method for detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exper. Med., 91, 1, 1950a.
COONS, A.H., SNYDER, J.C., CHEEVER, F.S. en MURRAY, E.S.: Localization of antigen in tissue cells IV Antigens of Richettsiae and mumphs virus. J. Exper. Med., 91, 31, 1950b.
COUNCIL on Pharmacy and Chemistry: Purified Corticotropin. J.A.M.A. 151, 474, 1953.
DIXON, H.B.F., STACK-DUNNE, N.P., YOUNG, F.G. en CATER, D.B.: Influence of adrenocorticotropic hormone fractions on „adrenal repair" and on adrenal ascorbic acid. Nature, 168, 1084, 1951.
EISEN, H.N. en KESTON, A.G.: Immunologic reactivity of bovine serum albumin labelled with traceamounts of radioactive iodine (I^{131}). J. Immunol., 63, 71, 1949.
EKEHORN, G.: On the principles of renal function. Acta Med. Scand. suppl., 36, 1931.
ELGEE, B.J., WILLIAMS, R.H. en LEE, N.D.: Distribution and degradation studies with insulin-I^{131}. J. Clin. Invest., 33, 1252, 1954.
ELMAN, R. en WOLF DAVEY, H.: Studies on hypoalbuminuria produced by protein deficient diets. J. Exper. Med., 77, 1, 1943.
FARRIS, E.J. en GRIFFITH, J.Q.: The rat in laboratory investigation. 1949.
FERREBEE, J.W., JOHNSON, B.B., MITHOEFER, J.C. and GARDELLA, J.W.: Insulin and adrenocorticotrophic labelled with radioiodine. Endocrinology, 48, 277, 1951.
FINE, J. en SELIGMAN, A.M.: Traumatic shock; study of problem of „lost plasma" in hemorrhagic shock by use of radioactive plasma protein. J. Clin. Invest. 22, 285, 1943.
FINK, R.M., ENNS, T., KIMBALL, C.P., SILVERSTEIN, H.E., BALE, W.F., MADDEN, S.C. en WHIPPLE, G.H.: Plasma-protein metabolism normal and associated with shock. J. Exper. Med., 80, 455, 1944.
FISHER, R.A.: Statistical methods for research workers. Edinburgh 1950.
FITZGERALD, P.J.: Radioautography in cancer. Cancer, 5, 166, 1952.
FITZGERALD, P.J., SIMMEL, E., WEINSTEIN, J. en MARTIN, C.: Radioautography theory, technic applications. Lab. Invest., 2, 181, 1953.
FRANCIS, G.E., MULLIGAN, W. en WORMALL, A.: Labelling of proteins with iodine^{131}; sulphur^{35} and phosphorus^{32}. Nature, 167, 748, 1951.
GANONG, W.F.: The effect of ACTH on adrenal size in hypophysectomized rats after removal of one adrenal. Endocrinology 55, 117, 1954.
GEMZELL, C.A., DIJKE, D.C. van, TOBIAS, C.A. en EVANS, H.M.: Increase in the formation and secretion of ACTH following adrenalectomy. Endocrinology 49, 325, 1951.

GERARD, P.: Comparative histophysiology of the vertebrate nephron. J. Anat., 70, 354, 1936.
GESCHWIND, J. J., HESS, G. P., CONDLIFFE, P.G. en WILLIAMS, B. G.: Preparation of nonprotein fractions possessing adrenocorticotrophin activity from sheep ACTH protein. Science, 111, 625, 1950.
GOSLINGS, J., HIJMANS, W., QUERIDO, A. en KASSENAAR, A. A. H.: Further experiences with prolonged treatment of rheumatoid arthritis with ACTH and with gold. Brit. Med. J. II, 698, 1951.
GOSLINGS, J., QUERIDO, A., HIJMANS, W. en KASSENAAR, A. A. H.: Over resistentieproblemen tijdens ACTH-behandeling. ACTH en Cortison. Scheltema en Holkema N. V. Amsterdam 1952.
GOSLINGS, J., QUERIDO, A., CATS, A. en KASSENAAR, A. A. H.: Evaluation of corticotrophin (ACTH) in patients. Acta Med. Scandinav., 148, 343, 1954.
GREENSPAN, F. S., LI, C. H., en EVANS, H. M.: Disappearance rate of adrenocorticotrophic hormone from rat's plasma after intravenous injection. Endocrinology 46, 261, 1950.
GROEN, J., KAMMINGA, C. E., WILLEBRANDS, A.F. en BLIEKMAN, J. R.: Evidence for the presence of insulin in blood serum; a method for an approximate determination of the insulin content of blood. J. Clin. Invest., 31, 97, 1952.
GROSS, J. en LEBLOND, C.P.: Metabolism of the thyroid hormone in the rat as shown by physiological doses of labelled thyroxine. J. Biol. Chem., 184, 489, 1950.
HAUGAARD, N., VAUGHAM, M., HAUGAARD, E. S. en STADIE, W. C.: Studies of radioactive injected labelled insulin. J. Biol. Chem., 208, 549, 1954.
HAUROWITZ, F., SARAFIAN, K. en SCHWERIN, P.: Antigenic properties of substituted serum-globulin. J. Immunol., 40, 391, 1941.
HECHTER, O., ZAFFARONI, A., JACOBSEN, R. P., LEVY, H., JEANLOZ, R. W., SCHENNER, V. en PINCUS, G.: The nature and the biogenesis of the adrenal secretory product. Rec. progress in Hormone Res., 6, 215, 1951.
HEIDELBERGER, M., TREFFERS, H. P., SCHOENHEIMER, R., RATNER, S. en RITTENBERG, D.: Behaviour of antibody protein toward dietary nitrogen in active and passive immunity. J. Biol. Chem., 144, 555, 1952.
HEILDEBERGER, M., KENDALL, F. E. en SOO HOO, C. M.: Quantitative studies on precipitin reaction. Antibody production in rabbits injected with azo-protein. J. Exper. Med., 58, 137, 1933.
HENZE, M.: Zur Kenntnis der Jod bindende Gruppe der natürlich vorkommende jodeiweisskörper. Z. Physiol. Chem. 51 64, 1907.
HIJMANS, W.: Corticotrophine en cortison. De Erven F. Bohn N. V. Haarlem 1952.
HILL, A. G. S., DEANE, H. W. en COONS, A. H.: Localization of antigen in tissue cells; capsular polysaccharide of Friedländer bacillus, type B, in mouse. J. Exper. Med., 92, 35, 1950.

HILL, B. H. R. en SWINBURN, P. D.: Death from corticotrophin. Lancet I, 1218, 1954.
HOLMAN, R. L., MAHONEY, E. B. en WHIPPLE, G. H.: Blood plasma protein given by vein utilized in body metabolism. J. Exper. Med., 59, 269, 1934.
HOLT, M. W., COWING, R. F. en WARREN, S.: Preparation of radioactive graphs of tissues without loss of water-soluble P^{32}. Science, 110, 328, 1949.
INGLE, D. J.: (1949) zie FARRIS, E. J.
INGLE, D. J. en BAKER, B. L.: Physiological and therapeutic effects of corticotrophin (ACTH) and cortisone. Thomas C. C. Springfield 1953.
INGLE, D. J. en BAKER, B. L.: A consideration of the relationship of experimentally produced and naturally occurring pathologic changes in the rat to the adaptation diseases. Rec. Progr. in Hormone Res., 8, 143, 1953.
INGLE, D. J., NEZAMIS, J. E. en MORLEY, E. H.: An extra-adrenal effect of some commercial preparations of corticotrophin upon the work performance of the hypophysectomized rat. Endocrinology 53, 24, 1953.
KAPLAN, M. H., COONS, A. H. en DEANE, H. W.: Localization of antigen in tissue cells; cellular distribution of pneumococcal polysaccharides types II and III in mouse. J. Exper. Med., 91, 15, 1950.
KASSENAAR, A. A. H., c. s.: Metabolic fate of thyreotrophic hormon. Acta Endocrinol., to be publ., 1955.
KLEZKOWSKI, R., Quantitative investigation of changes in antigenic properties in the course of iodination of horse-serum globuline. Brit. J. Exp. Path. 21, 98, 1940.
LAMBERT, P.: Sur l'existence d'un gradient de permeabilité dans les nephrons ouverts des urodèles, Compt. rend. soc. biol. 125, 1049, 1937.
LANDMAN, W. A., DRAKE, M. P. en WHITE, W. F.: Studies on pituitary adrenocorticotrophin. An n-terminal sequence of corticotrophin-A. J. Am. Chem. Soc., 75, 4370, 1953.
LANDSTEINER, K. en LAMPL, H.: Ueber die antigen eigenschaften von Azoproteinen. Z. f. Immun. Forsch., 26, 293, 1917.
LAWS, J. O.: Fate of radioactive protein in the animal body. Nature, 167, 820, 1951.
LI, C. H., EVANS, H. M. en SIMPSON, M. E.: Adrenocorticotrophic hormone. J. Biol. Chem., 149, 413, 1943.
LI, C. H., SIMPSON, M. E. en EVANS, H. M.: The effects of various reagents on adrenocorticotrophic hormone. Arch. Biochem., 9, 259, 1946.
LI, C. H.: Recent studies on the problems involved in the preparation, properties and bioassay of adrenocorticotrophic hormone. Acta Endocrinol., 10, 256, 1952.
LI, C. H., GESCHWIND, I. I., LEVY, A. L., HARRIS, J. S., DIXON, S., PONG, M. J. en PORATH, J. O.: Isolation and properties of alpha-corticotrophin from sheep pituitary glands. Nature, 173, 251, 1954.
LICHTY, J. A., HAVILL, W. H. en WHIPPLE, G. H.: Renal thresholds for hemoglobin in dogs. J. Exper. Med., 55, 603, 1932.

LIDDLE, G. W., ISLAND, D., RINFRET, A. P. en FORSHAM, P. H.: Factors enchancing response of human adrenal to ACTH: is there an adrenal growth factor? J. Clin. Endocrinol., 14, 839, 1954.
LIPPMAN, R. W.: Mechanism of proteinuria; effect of parenteral bovine albumin injections on hemoglobin excretion in rats. Am. J. Physiol. 154, 532, 1948.
LIPPMAN, R. W., UREEN, H. J. en OLIVER, J.: Mechanism of proteinuria. J. Exper. Med., 93, 325, 1951.
LISON, L.: Sur les potentialités athrocytaires du segment a brosse ru rein, chez le crapaud après ligature des artères rénales. Compt. rend. Soc. Biol., 125, 1049, 1937.
LYONS, W. R.: Preparation and assay of mammotropic hormone. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 35, 645, 1937.
MELCHIOR, L. R., MASOUREDIS, S. P. en SHIMKIN, M. B.: The effect of rabbit antibody administration on the behavior of I^{131} labelled human serum albumin in mice. J. Immunol., 71, 275, 1953.
MILLER, L. L., BALE, W. F., YUILE, C. L., MARTUS, R. E., FISCHHOFF, G. H. en WHIPPLE, G. H.: The use of radioactive lysine in studies of protein metabolism. J. Exper. Med., 90, 297, 1949.
MILLER, L. L. en BALE, W. F.: Synthesis of all plasma protein fractions except gamma globulins by the liver. The use of zone electrophoresis and lysine-Σ-C^{14} to define the plasma proteins synthesizes by the isolated perfused liver. J. Exper. Med., 99, 125, 1954.
MILLER, L. L., BLY, C. G. en BALE, W. F.: Plasma and tissue proteins produced by non-hepatic rat organs as studied with lysine-Σ-C^{14}. Gamma globulins the chief plasma protein fraction produced by non-hepatic tissues. J. Exper. Med., 99, 133, 1954.
MONKE, J. V. en YUILE, C. L.: The renal clearance of hemoglobin in the dog. J. Exper. Med., 72, 149, 1940.
MYANT, N. B.: Observations on the metabolism of human gamma globulin labelled by radioactive iodine. Clin. Sc., 11, 191, 1952.
NEWMAN, W. V. en WHIPPLE, G. H.: Hemoglobin injections and conservation of pigment by kidney, liver and spleen. J. Exper. Med., 55, 637, 1932.
NUSSBAUM, M.: Ueber die Secretion der Niere. Arch. f. g. Physiol., 16, 139, 1878.
OBERMAYER, F. en PICK, E. P.: Ueber die chemische Grundlagen der Arteigenschaften der Eiweiszkörper. Wien. Klin. Wchnschr., 19, 327, 1906.
OLIVER, J.: New directions in renal morphology: a method, its results and the future. Harvey Lectures Ser. XL, 1944-1945.
OLIVER, J., MOSES, M. J., McDONALD, M. C. en LEE, Y. C.: Cellular mechanisms of protein metabolism in the nephron. J. Exper. Med., 99, 605, 1954.
OSWALD, A.: Gewinnung von 3, 5 dijodtyrosin aus Jodeiweisz. Z. Physiol. Chem., 70, 310, 1910; 71, 210, 1911 en 74, 290, 1911.

PARIS, J., UPSON, M., RANDALL, G., SPRAQUE, R. J., SALASSA, R. M. en ALBERT, A.: Corticotrophic activity of human blood. J. Clin. Endocrinol., 14, 597, 1954.
PAULY, H.: Ueber jodierte abkömmlinge des Imidazols und des Histidins. Ber. dtsch. Chem. Ges., 43, 2243, 1910.
PINCUS, G., HOPKINS, T. F. en HECHTER, O.: An ACTH-inactivating factor in mammalian blood. Arch. of Biochem. and Bioph., 37, 408, 1952.
PRESSMAN, D.: The in vivo disposition of anti-mouse-kidney serum and anti-mouse-plasma serum as determined by radioactive tracers. J. Immunol. 63, 375, 1949.
PRESSMAN, D. e.a.: Zone of localization of antibodies; use of radioactive sulfur 35 as label for anti-kidney serum. J. Immunol., 65, 559, 1950.
PRESSMAN, D. en EISEN, H. N.: An attempt to saturate antibody-binding sites in mouse kidney. J. Immunol., 64, 273, 1950a.
PRESSMAN, D. en STERNBERGER, L. A.: The relative rates of iodination of serum components and the effect of iodination on antibody activity. J. Am. Chem. Soc., 72, 2226, 1950b.
QUERIDO, A., KASSENAAR, A. A. H. en LAMEYER, L. D. F.: Assay of thyrotrophic hormone by means of I^{131} uptake in thyroid glands of iodocasein treated mice. Act. Endocrinol., 12, 335, 1953.
QUERIDO, A., KASSENAAR, A. A. H. en CATS, A.: The application of the determination of the blood 17 OH corticoid level to the study of adrenocortical activity. The Ciba Foundation. Symposium on the human adrenal cortex. 1954.
QUERIDO, A., KASSENAAR, A. A. H. en LAMEYER, L. D. F.: The identification of the thyrotrophic hormone containing protein of human serum. In press. 1955.
REINER, L. en LANG, E. H.: Insulin azo-derivatives. J. Biol. Chem., 139, 641, 1941.
REINER, L., KESTON, A. S. en GREEN, M.: The absorption and distribution of insulin labelled with radioactive iodine. Science, 96, 362, 1942.
RICHARDS, J. B. en SAYERS, G.: Fate and excretion of adrenocorticotrophic hormone. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 77, 87, 1951.
RIGAS, D. A. en HELLER, C. G.: The amount and nature of urinary protein in normal human subjects. J. Clin. Investigation, 30, 853, 1951.
RINFRET, A. P.: Zie Liddle 1954.
RITTENBERG, D.: A method for the evaluation of the rate of protein synthesis in man. Isotopes in Biochem. Ciba Foundation Conf. J. & A. Churchill Ltd., London 1951.
RUBIN, B. L., DORFMAN, R. I. en MILLER, M.: Hormone metabolites in blood of urine of diabetic pregnant patients with and with out toxemia. J. Clin. Endocrinol., 6, 347, 1946.
RUBIN, B. L., DORFMAN, R. I. en DORFMAN, A.: Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in urine. J. Clin. Endocrinol., 14, 154, 1954.
SANDBERG, A. A., NELSON, D. H., PALMER, J. G., SAMUELS, L. T. en TYLER, F. H.: The effects of epinephrine on the metabolism of 17-hydroxycorticosteroid in the human. J. Clin. Endocrinol., 13, 629, 1953.

SAYERS, G., WHITE, A. en LONG, C. N. H.: Preparation and properties of pituitary adrenotrophic hormone. J. Biol. Chem., 149, 425, 1943.
SAYERS, G., BURNS, T. W., TYLER, F. H., JAGER, B. V., SCHWARTZ, T. B., e. a.: Metabolic actions and fate of intravenously administrated adrenocorticotrophic hormone in man. J. Clin. Endocrinol., 9, 593, 1949.
SAYERS, G.: The adrenal cortex and homeostasis. Physiol. Rev. 30, 241, 1950.
SAYERS, M. A., SAYERS, G. en WOODBURY, L. A.: The assay of adrenocorticotrophic hormone by the adrenal ascorbic acid-depletion method. Endocrinology, 42, 379, 1948.
SCHILLER, A. A., SCHAYER, R. W. en HESS, E. L.: Fluorescein-conjugated bovine albumin. J. Gen. Physiol., 36, 489, 1953.
SCHOENHEIMER, R.: The dynamic state of body constituents. Harvard Univ. Press. Cambridge. 1950.
SELYE, H.: The physiology and pathology of exposure to stress, Montreal 1950.
SHAROKH, B. K.: Preparation and properties of crystalline labelled antigen. J. Biol. Chem., 151, 659, 1943.
SIROTA, J. H., YU, T. F. en GUTMAN, A. B.: Effect of benemid on urate clearance and other discrete renal function in gouty subjects. J. Clin. Investigation, 31, 692, 1952.
SMITH, P. E. en SMITH, I. P.: The function of the lobes of the hypophysis as indicated by the placement therapy with different portions of the ox-gland. Endocrinology, 7, 579, 1923.
SMITH, P. E.: The disabilities caused by hypophysectomy and their repair. J. A. M. A., 88, 158, 1927.
SONENBERG, M., KESTON, A. S. en MONEY, W. L.: Studies with labelled anterior pituitary preparations: adrenocorticotropin. Endocrinology, 48, 148, 1951a.
SONENBERG, M., MONEY, W. L., KESTON, A. S., FITZGERALD, P. J. en GODWIN, J. T.: Localization of radioactivity after administration of labelled prolactin preparations to the female rat. Endocrinology, 49, 709, 1951b.
SPRINSON, D. B. en RITTENBERG, D.: The rate of interactions of the diet with the tissue proteins. J. Biol. Chem., 180, 715, 1949.
SPRINSON, D. B. en RITTENBERG, D.: Zie Rittenberg 1951.
STERLING, K.: The turnover rate of serum albumin in man as measured by I^{131}-tagged albumin. J. Clin. Investigation, 30, 1228, 1951.
STETTEN, J. De Witt: Thermodynamic, kinetic and biologic stability. Am. J. Med., 13, 251, 1952.
SYDNOR, K. L. en SAYERS, G.: A technic for determination of adrenocorticotrophin in blood. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 79, 432, 1952.
SYDNOR, K. L., KELLEY, V. C., RAILE, R. B., ELY, R. S. en SAYERS, G.: Blood adrenocorticotrophin in children with congenital adrenal hyperplasia. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 82, 695, 1953a.

SYDNOR, K. L. en SAYERS, G.: Biological half-life of endogenous ACTH. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 83, 729, 1953b.
TALMAGE, D. W., DIXON, F. J., BUKANTZ, S. C. en DAMMIN, G. J.: Antigen elimination from the blood as an early manifestation of the immune response. J. Immunol., 67, 243, 1951.
THORN, G. W., JENKINS, D., LAIDLAW, J. C. en GOETZ, F. C.: Pharmacological aspects of adrenocortical steroid and ACTH in man. New. Engl. J. of Med., 248, 232, 1953.
VEALL, N.: Geiger-Müller counter for measuring beta-ray activity of liquids and its application to medical traces experiments. Brit. J. Radiol., 21, 445, 1948.
WALKER, A. M., BOTT, P. A., OLIVER, J. en McDOWELL, M. C.: The collection and analysis of fluid from single nephrons of the mammalian kidney. Am. J. Physiol., 134, 580, 1941.
WEARN, J. T. en RICHARDS, A. N.: Observations on the composition of glomerular urine, with particular reference to the problem of the reabsorption in the renal tubulus. Am. J. Physiol., 71, 209, 1924.
WHEELER, H. L. S. en JAMIESON, G. S.: Synthesis of iodgorgoic acid. Am. Chem. J., 33, 365, 1905.
WHITE, W. F. en FIERCE, W. L.: Studies on pituitary adrenocorticotropin. Differentiation of three active types on XE-97 Resin. J. Am. Chem. Soc., 75, 503, 1953.
WHITE, W. F.: Studies on pituitary adrenocorticotropin. A C-terminal sequence of corticotropin-A. J. Am. Chem. Soc., 75, 4877, 1953.
WHITE, W. F.: Studies on pituitary adrenocorticotropin. Further sequences near the C-terminus. J. Am. Chem. Soc., 76, 4194, 1954.
WIJNANS, M.: Bijdrage tot het vraagstuk van de consumptie van eiwitachtige hormonen. Acad. Proefschrift. Leiden 1952.
WILSON, L. A.: Protein shock from intarvenous ACTH. Lancet ii, 478, 1951.
WORMALL, A.: The immunological specifity of chemically altered proteins. J. Exper. Med., 51, 295, 1930.
YUILE, C. L., STEINMAN, J. F., HAHN, P. F. en CLARK, W. F.: The tubular factor in renal hemoglobin excretion. J. Exper. Med., 74, 197, 1941.
YUILE, C. L., LAMSON, B. G., MILLER, L. I. en WHIPPLE, G. H.: Conversion of plasma protein to tissue protein without evidence of protein breakdown. J. Exper. Med., 93, 539, 1951.
YUILE, C. L., O'DEA, A. E., LUCAS, F. V. en WHIPPLE, G. H.: Plasma protein labelled with lysine-Σ-C^{14}. J. Exper. Med., 96, 247, 1952.